



Carolina Andreia Lopes Magro

Licenciada em Biologia

**Avaliação preliminar da Qualidade,
Segurança e Perfil Nutricional da fração
edível de *Crassostrea* spp. selvagem e
de aquacultura no Sado.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologias de Produção e Transformação Agro-Industrial

Orientadora: Dr^a. Maria Fernanda Guedes Pessoa,
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadora: Dr^a. Helena Maria Gomes Lourenço,
Investigadora Auxiliar, Instituto Português
do Mar e da Atmosfera, I.P.

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo

Vogais: Prof^a. Doutora Maria Luísa Faria de Castro Castro e Lemos
Doutora Helena Maria Gomes Lourenço



Universidade Nova de Lisboa
Faculdade de Ciências e Tecnologia



Avaliação preliminar da Qualidade, Segurança e Perfil Nutricional da fração edível de *Crassostrea* spp. selvagem e de aquacultura no Sado.

Carolina Andreia Lopes Magro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologias de Produção e
Transformação Agro-Industrial

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Fernanda Guedes Pessoa, Professora Auxiliar,
Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa
Co-orientadora: Dr^ª. Helena Maria Gomes Lourenço, Investigadora Auxiliar,
Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P.

Setembro, 2016

**Avaliação preliminar da Qualidade, Segurança e Perfil Nutricional da fração edível de
Crassostrea spp. selvagem e de aquicultura no Sado.**

Copyright © Carolina Andreia Lopes Magro

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*“It does not matter how slowly you go
as long as you do not stop.”*

- Confúcio

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, à minha orientadora Professora Doutora Maria Fernanda Pessoa, por me ter proporcionado um tema de dissertação, por ter feito tudo ao seu alcance para que fosse possível a realização deste trabalho e por me ter apoiado e transmitido calma nos momentos mais difíceis.

À minha co-orientadora Doutora Helena Lourenço, agradeço imenso a sua simpatia, disponibilidade, fundamental ajuda e preciosa transmissão de conhecimentos não só durante o meu tempo no laboratório, mas também até ao culminar deste trabalho.

Ao Professor Doutor Fernando Lidon, por todo o apoio prestado ao longo do mestrado e por todos os ensinamentos que me transmitiu.

Ao IPMA, I.P. em geral e à Doutora Fernanda Martins e Doutora Narcisa Bandarra em particular, que me permitiram realizar as determinações químicas nas suas instalações, mais precisamente na Divisão de Aquacultura e Valorização. A todas as pessoas que lá tive o prazer de conhecer e que me bem receberam. Um especial obrigado à Margarida Muro, pela sua paciência e valiosa ajuda no laboratório.

À Herdade do Pinheiro, Ostradamus S.A. e Exporsado Lda., pelo fornecimento das ostras que permitiram a realização deste estudo, e ao Pedro Martins que ajudou em todo o processo.

Aos meus amigos, que com o seu companheirismo e humor tornaram mais fácil este desafio.

À minha família, por nunca desistirem de mim mesmo em tempos mais difíceis e por me permitirem e incentivarem e a completar mais uma etapa, é a eles que dedico este trabalho.

A todos o mais sincero obrigado!

RESUMO

A ostra (*Crassostrea* spp.) é o terceiro molusco mais produzido em território nacional e assume uma importância não só económica e gastronómica, mas também nutricional. O estuário do Sado é conhecido como local de excelência para o desenvolvimento da ostra, porém, apesar de ser legalmente protegido sofre de uma elevada ação antropogénica. Dada a sua natureza filtradora, as ostras têm maior tendência a acumular compostos, como metais pesados, nos seus tecidos moles o que, aliado à industrialização do estuário, pode constituir um problema de segurança alimentar. Com a colaboração de produtores locais de ostra portuguesa e do Pacífico, realizou-se uma avaliação preliminar da qualidade, segurança e perfil nutricional da fração edível destas espécies. Dos índices de qualidade calculados, o AFNOR indicou estatuto “especial”, ou seja, elevado valor comercial em todas as amostras. O STI determinou contaminação intermédia em apenas duas amostras (BN e HP) e pouca ou nenhuma nas restantes. De um ponto de vista nutricional, todas as amostras analisadas são ricas em ferro e zinco, e são fonte de cálcio e de potássio, enquanto que apenas a amostra proveniente do banco natural é rica em cálcio. Dado o elevado espessamento da concha desta amostra, deduz-se que a acumulação de cálcio na concha provocada por compostos contaminantes também tenha reflexão na fração edível da ostra. Apesar do seu bom conteúdo mineral, as amostras com maiores teores também foram as que registaram um maior teor de cádmio (HP, BN, HPSM), tendo uma delas ultrapassado ligeiramente o limite legal imposto pela UE para a comercialização de bivalves (1,1 mg/kg). Contudo, estes teores são apenas nocivos se forem ingeridas quantidades consideráveis por semana (≈ 136 g/14 ostras da amostra mais contaminada, por uma pessoa de 60 kg). A composição química e mineral das ostras selvagens distingue-se das ostras cultivadas em aquacultura. Conclui-se que a ostra do Sado tem, de um modo geral, relativamente boa qualidade para os produtores e consumidores, mostrando rica composição química e mineral com elevados teores de proteína e baixos teores de gordura e glicogénio, provando ser uma boa aposta, não só do ponto de vista nutricional como gastronómico.

PALAVRAS-CHAVE: ostra; *Crassostrea*; ostra do pacífico; ostra portuguesa; qualidade; perfil nutricional; perfil mineral; contaminantes; cádmio.

ABSTRACT

Oysters (*Crassostrea* spp.) are the third most produced mollusc in Portugal and takes up not only economic and gastronomic relevance, but also nutritional importance. The Sado estuary is known as an excellent place for the oyster's optimal development, however, although it is legally protected still suffers from high anthropogenic influence. Given their filtrating nature, oysters have more tendency to accumulate compounds, such as heavy metals, in their edible parts which, added to the estuary's industrialization, can constitute a food health issue. In collaboration with local producers of Portuguese and Pacific oysters, a preliminary evaluation of the quality, safety and nutritional profile of their edible fraction was conducted. Of the quality indexes calculated, the AFNOR indicated a "special" statute in all samples, meaning all have high commercial value. The Shell Thickness Index determined medium contamination only in two samples (BN and HP) and low or none in the remainder. From a nutritional point of view, all analysed samples are rich in iron and zinc, and source of calcium and potassium, while only the natural bank sample is calcium rich. Given the high thickness of the shell in this last sample, one deduces that shell calcium accumulation caused by contaminants also has effect on the oyster's edible fraction. Regardless of their good mineral content, samples with higher mineral concentrations are also the ones which showed higher cadmium levels (HP, BN, HPSM) and even one slightly surpassed the EU legal limit set to bivalve commercialization (1,1 mg/kg). However, these levels are only damaging if considerable quantities per week are ingested (≈ 136 g/14 oysters from the most contaminated sample, by a 60 kg person). The wild oyster's chemical and mineral composition distinguishes itself from the ones cultivated in aquaculture. In conclusion, the Sado oyster generally has relatively good quality for the producers and consumers, showing a rich chemical and mineral composition with high levels of protein and low levels of fat and glycogen, not only proving to be a good gastronomic choice but also a nutritional one.

KEYWORDS: *oyster; Crassostrea; Pacific oyster; Portuguese oyster; quality; nutritional profile; mineral profile; contaminants; cadmium.*

ÍNDICE DE MATÉRIAS

Agradecimentos	IX
Resumo	XI
Abstract	XIII
Índice de Matérias	XV
Índice de Figuras	XVIII
Índice de Tabelas	XX
Lista de Abreviaturas	XXII
1 Introdução	1
1.1 Objetivos	1
1.2 Aquacultura da Ostra	2
1.2.1 Estatísticas de produção	3
1.2.2 Métodos de cultura	3
1.3 <i>Crassostrea angulata</i> e <i>Crassostrea gigas</i>	4
1.3.1 Descrição sistemática	4
1.3.2 Origem e distribuição geográfica	5
1.3.3 Habitat	5
1.3.4 Anatomia	6
1.3.5 Nutrição, reprodução e ciclo de vida	6
1.4 Estuário do Sado	7
1.5 Qualidade e Segurança	8
1.5.1 Contaminantes ambientais	9
1.5.2 Perfil nutricional de <i>Crassostrea</i> spp.	12
2 Materiais e Métodos	16
2.1 Descrição dos conjuntos de amostras de ostra	16
2.2 Biometria e Preparação das amostras	17
2.3 Índices de Qualidade	18
2.4 Determinações analíticas	18

2.4.1	Composição química aproximada	19
2.4.2	Caraterização mineral	20
2.5	Análise estatística	21
3	<i>Resultados e Discussão</i>	23
3.1	Biometria	23
3.2	Qualidade	24
3.2.1	Índice de Qualidade AFNOR	24
3.2.2	Índice de Espessamento da Concha (STI)	24
3.3	Segurança	25
3.3.1	Composição mineral	25
3.4	Perfil nutricional de <i>Crassostrea</i> spp.	29
3.4.1	Composição química aproximada	29
3.4.2	Composição mineral	31
4	<i>Conclusões e perspectivas futuras</i>	36
5	<i>Referências Bibliográficas</i>	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Distribuição atual das espécies <i>C. angulata</i> e <i>C. gigas</i> (Batista, 2007).	5
Figura 1.2 – Vista interior e exterior da valva esquerda de <i>C. gigas</i> . (http://www.willabay.com/images/pacificoysters.jpg)	6
Figura 1.3 - Esquema ilustrativo do ciclo geral da contaminação por metais pesados. (Rocha, 2009) Erro! Marcador não definido.	
Figura 1.4 - Teor de cádmio (mg/kg) no estuário exterior do Sado analisado por Caeiro <i>et al.</i> (2005). __	11
Figura 2.1 - Estuário do Sado e localizações dos locais de colheita das amostras. G – <i>C. gigas</i> fornecida pela Ostradamus S.A.; ES – <i>C. angulata</i> fornecida pela produtora Exporsado; HP – <i>C. angulata</i> fornecida pela Herdade do Pinheiro; HPSA – <i>C. angulata</i> juvenil proveniente do Algarve mas cultivada e fornecida pela Herdade do Pinheiro; HPSM – <i>C. angulata</i> juvenil proveniente do estuário do Mira mas cultivada e fornecida pela Herdade do Pinheiro; BN – <i>C. angulata</i> proveniente do Banco Natural local. Imagem adaptada de Google Maps.	177
Figura 2.2 – Demonstração do funcionamento do analisador utilizado, Niton Thermo Scientific XL3t (http://acceleratingscience.com/mining/wp-content/uploads/sites/3/2016/04/gun-diagram.jpg ; http://www.911metallurgist.com/blog/wp-content/uploads/2013/08/XRF-primary-x-ray-radiation.jpg).	20

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Dados da literatura relativos à composição química aproximada (%) de <i>Crassostrea</i> spp.	12
Tabela 1.2 - Dose Diária Recomendada (DDR) dos minerais presentes na ostra, expressos em mg e valores minerais de referência em <i>C. gigas</i> , expressos em mg/100 g. * Não definida, estimada por Lidon & Silvestre (2010).	14
Tabela 2.1 – Descrição e caracterização das amostras estudadas.	16
Tabela 3.1 - Médias e respetivos desvios padrão dos dados biométricos (mm), pesos totais (g) e Índices AFNOR das várias amostras.	23
Tabela 3.2 - Número de indivíduos fornecidos para análise, número de efetivos e mortalidade para cada amostra.	24
Tabela 3.3 - Índices de espessamento da concha (STI) calculados para cada amostra (média ± desvio padrão).	25
Tabela 3.4 – Teores dos minerais detetados pelo Método Espectrofotométrico de Fluorescência Raio-X de Energia Dispersiva e respetivas médias dos limites de deteção (LD), medidos em matriz seca e expressos em mg/kg. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre amostras, com intervalo de confiança de 95%.	25
Tabela 3.5 - Composição química aproximada (%) em matriz húmida das amostras analisadas (média ± desvio padrão). Letras diferentes representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre amostras, com intervalo de confiança de 95%. *Valor estimado.	29
Tabela 3.6 - Teores dos minerais com relevância nutricional detetados pelo Método Espectrofotométrico de Fluorescência Raio-X de Energia Dispersiva e respetivas médias dos limites de deteção (LD), medidos em matriz seca e expressos em mg/kg. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre amostras, com intervalo de confiança de 95 %.	32
Tabela 3.7 - Percentagens de DDR do teor dos minerais calculadas para 100 g de amostra em matriz húmida.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AFNOR – Associação Francesa de Normalização (*Association Française de Normalisation*)

ANOVA – Análise de Variância (*Analysis of Variance*)

BN – Amostra da espécie *Crassostrea angulata*, proveniente do Banco Natural

CE – Comunidade Europeia

CEE – Comunidade Económica Europeia

DDR – Dose Diária Recomendada

ED-XRF – Método Espectrofotométrico de Fluorescência Raio-X de Energia Dispersiva

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*)

EN – Norma Europeia (*European Norm*)

ES – Amostra da espécie *Crassostrea angulata*, fornecida pela Exporsado, S.A.

G – Amostra da espécie *Crassostrea gigas*, fornecida pela Ostradamus, Lda.

HP – Amostra da espécie *Crassostrea angulata*, fornecida pela Herdade do Pinheiro.

INE, I.P. – Instituto Nacional de Estatística, I.P.

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IPQ, I.P. – Instituto Português da Qualidade, I.P.

IPMA, I.P. – Instituto Português do Mar e da Atmosfera, I.P.

IPIMAR – Instituto de Investigação das Pescas e do Mar (integrado atualmente no IPMA, I.P.)

LD – Limite de Detecção

NP – Norma Portuguesa

NF – Norma Francesa

PIB – Produto Interno Bruto

HPSA – Amostra da espécie *Crassostrea angulata*, fornecida pela Herdade do Pinheiro, proveniente do Algarve, cultivada durante 7 meses.

HPSM – Amostra da espécie *Crassostrea angulata*, fornecida pela Herdade do Pinheiro, proveniente do Rio Mira, cultivada durante 10 meses.

STI – Índice de Espessamento da Concha (*Shell Thickness Index*)

TBT – Tributil-de-estanho

UE – União Europeia

1 INTRODUÇÃO

A ostra (*Crassostrea* spp.) é o terceiro molusco mais produzido em território nacional e assume uma importância não só económica e gastronómica, mas também nutricional.

O estuário do Sado está provado ser um local de excelência para o desenvolvimento da ostra, com estas a atingirem superiores índices de crescimento relativamente às cultivadas em França. No entanto, apesar de ser um local protegido sofre também de uma forte ação antropogénica.

Dada a sua natureza filtradora, os bivalves, e as ostras em particular, têm maior tendência a acumular compostos nos seus tecidos moles, como metais pesados, o que, aliado à industrialização do estuário, pode constituir um problema de segurança alimentar.

Cada vez mais a questão da qualidade e segurança dos produtos alimentares está presente na sociedade atual, apresentando-se como uma prioridade tanto para os profissionais do setor alimentar e autoridades de fiscalização da saúde pública, como para o próprio consumidor.

Por esta razão, é importante avaliar a qualidade, segurança e perfil nutricional, assim como o estado comercial da ostra neste estuário com o objetivo de melhorar e aumentar a sua produção, gerando maiores receitas e dinamizando a região através da promoção de um produto nacional de excelência.

1.1 OBJETIVOS

- Avaliação da qualidade de *Crassostrea* spp. selvagem e de aquacultura, proveniente de diferentes zonas do estuário do Sado e em várias fases de desenvolvimento.
 - Caracterização mineral de *Crassostrea* spp.
 - Avaliação do perfil nutricional de *Crassostrea* spp.
 - Avaliação de eventual contaminação por metais pesados nas diferentes zonas de produção estudadas e ainda no banco natural;
- Avaliação do estado comercial, com interesse para a indústria de acordo com a zona de produção;
- Comparação de duas metodologias de análise da fração edível para quantificação de metais pesados.

1.2 AQUACULTURA DA OSTRÁ

As ostras são uma fonte importante de alimento já desde a época da ocupação romana em Portugal (Pessoa & Oliveira, 2006). A produção de ostra portuguesa, *Crassostrea angulata*, nos estuários do Sado e Tejo representou uma importante contribuição para o PIB nacional até final dos anos 60, com a sua exportação para toda a Europa, maioritariamente para França (Batista, 2007; Pessoa & Oliveira, 2006). Entre 1964 e 1972 foram criadas várias empresas dedicadas a esta exploração no estuário do Sado, tendo sido exportadas mais de 50 mil toneladas de ostras durante este período (Pessoa & Oliveira, 2006). No entanto, nos finais dos anos 60 o intenso desenvolvimento industrial nas orlas de ambos os estuários, associado à sobre-exploração dos recursos, conduziu a uma diminuição acentuada no número de indivíduos (Pessoa & Oliveira, 2006). Por volta da mesma altura ocorreram em toda a Europa elevadas taxas de mortalidade associadas a várias patologias de origem viral, principalmente a “doença das brânquias” (Renault, 1996). Por consequência, a ostra deixou de ser economicamente rentável, tendo a sua produção e exportação diminuído consideravelmente a partir de então.

Dado o declínio de populações de *C. angulata*, uma outra espécie do mesmo género foi introduzida em França em 1970 (e mais tarde também em Portugal) de forma a continuar a produção em massa de ostra: *Crassostrea gigas*, vulgo ostra do Pacífico ou ostra japonesa. Esta espécie mostrava-se mais resistente às patologias e desenvolvia-se mais rapidamente (Batista, 2007). É de notar que *C. gigas* já tinha sido introduzida em menor escala anteriormente, o que aliado à sua resistência parcial ao vírus pode permitir especular que tenha sido desta forma que o agente patogénico causador das mortalidades em massa foi introduzido (Renault, 1996). Felizmente, algumas populações de *C. angulata* sobreviveram à mortalidade em massa e à hibridização com *C. gigas*, da qual há registos na Ria Formosa e que põe em causa a integridade genética das populações puras da ostra portuguesa (Batista, 2007).

De uma forma geral, os bivalves *Crassostrea* spp. são bastante versáteis e, por isso, adequados à aquacultura em conjunto com espécies piscícolas, dada sua natureza como bioindicadores e como agentes depuradores naturais. Assim, com esta cultura conjunta é possível detetar poluentes e simultaneamente evitar a eutrofização de sistemas de aquacultura de regime semi-intensivo através da sua capacidade filtradora (Pessoa, sem data). Adicionalmente, as condições do estuário do Sado estão provadas como as ideais para atingir taxas ótimas de crescimento, uma vez que em ensaios sem adição de alimento artificial as ostras atingiram o tamanho comercial em 6 meses, contrastando com os longos 24 a 36 meses que as mesmas demoram em França (Pessoa & Oliveira, 2006).

1.2.1 Estatísticas de produção

Segundo o INE, I.P., em 2014 os moluscos bivalves representaram cerca de metade (45%) da produção total em aquacultura em Portugal, em que as ostras representam o 3º molusco mais produzido (~1085 toneladas) tendo aumentado 36,6% em relação ao ano prévio. Esta subida na produção verifica-se após um aumento de investimentos da conversão de viveiros e espaços anteriormente utilizados para a produção de peixe, agora utilizados para a aquacultura de ostra. Em 2014 foram produzidas 527 toneladas de ostra do Pacífico, equivalendo a 1,108 milhões de euros; 136 toneladas de ostra portuguesa, equivalendo a 371 mil euros e 422 toneladas de outras espécies de ostra foram produzidas, equivalendo a 1,334 milhões de euros. Das 1085 toneladas produzidas, 870 foram comercializadas em solo nacional e apenas 12 foram exportadas (INE, 2016).

Atualmente em Portugal produz-se principalmente ostra do Pacífico, já que é possível adquirir ostras juvenis (“semente”) a unidades de reprodução existentes em França e Espanha (Pessoa, sem data), não estando dependentes do número flutuante de indivíduos juvenis nos bancos naturais existentes (Schuller, 1998). Também são produzidas a ostra portuguesa e, mais recentemente, a ostra plana (*Ostrea edulis*).

1.2.2 Métodos de cultura

A cultura de ostra, tal como a de bivalves em geral, passa primeiramente pela obtenção dos juvenis, a qual pode ser feita através da sua captação em bancos naturais, ou através da sua aquisição em maternidades. A última é escolhida quando o recrutamento natural não é abundante ou caso não existam bancos naturais da mesma por se tratar de uma espécie não nativa. Nas maternidades são controlados todos os aspetos reprodutivos da espécie a cultivar, desde o condicionamento dos reprodutores até se completar a gametogénese, passando pela desova, desenvolvimento larvar, metamorfose e desenvolvimento pós-larvar dos juvenis até atingirem tamanho para serem submetidos à engorda (Schuller, 1998).

A qualidade dos juvenis avalia-se pela sua taxa de crescimento e capacidade de sobrevivência. Não há um tamanho ideal para a aquisição dos juvenis, apesar da sua sobrevivência aumentar com o tamanho e, consequentemente, o seu preço comercial. A percentagem de sobrevivência para as ostras de comprimento inferior a 8 mm deve ser superior a 70% ao fim de 6 meses, considerando que o manejo seja adequado. Contudo, entre as diferentes criações de um mesmo fornecedor ocorrem variações na qualidade (Schuller, 1998).

Na fase seguinte da engorda, o método mais comum entre as explorações ostreícolas em Portugal é o método de cultivo em sobre-elevação com recurso a tabuleiros de madeira

cobertos por rede plástica ou sacos ostreícolas em malha plástica, os quais são colocados em mesas de estrutura metálica na zona intertidal (Schuller, 1998). Este método tem a vantagem de manter as ostras longe dos predadores, ao contrário do cultivo direto no sedimento.

Outro método em uso no Sado é o australiano, consistindo na suspensão de vários cestos/sacos ostreícolas cilíndricos em ganchos fixos em cabos de aço na zona intertidal (Schuller, 1998). Em relação ao método de tabuleiros, tem a vantagem de permitir uma maior renovação do oxigénio e libertação de impurezas, já que os cestos balançam com as marés.

Nos dois métodos, a alternância de exposição a fases de imersão/emersão aumenta a resistência dos moluscos, o que irá favorecer o tempo de vida útil em fase de comercialização (Schuller, 1998).

1.3 *CRASSOSTREA ANGULATA* E *CRASSOSTREA GIGAS*

1.3.1 Descrição sistemática

De acordo com (Gofas, 2015), *C. angulata* e *C. gigas* apresentam a seguinte posição sistemática:

Filo: Mollusca

Classe: Bivalvia

Subclasse: Pterimorphia

Ordem: Ostreoida

Superfamília: Ostreoidea

Família: Ostreidae

Subfamília: Crassostreinae

Género: *Crassostrea*

Espécie: *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819)

Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)

A ostra portuguesa foi inicialmente denominada como *Gryphaea angulata* por Lamarck em 1819, sendo posteriormente *Ostrea angulata*. Em 1897 foi descrita por Sacco como *Crassostrea angulata*. Neste género também se inclui a ostra do Pacífico, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), que partilha com *C. angulata* características anatómicas, da concha e de desova (Batista, 2007). A distinção entre estes dois taxa tem sido amplamente discutida, sendo que as principais razões para a sua diferenciação são a sua distribuição geográfica, dados

genéticos e morfológicos que evidenciam a sua sinonímia (Batista *et al.*, 2005). No entanto, análises ao gene que codifica o complexo citocromo oxidase da mitocôndria determinaram diferenças genéticas entre os dois taxa, sendo assim correcto afirmar que são espécies altamente relacionadas, mas distintas, embora capazes de originar híbridos férteis (Boudry *et al.*, 1998; O'Foighil *et al.*, 1998).

1.3.2 Origem e distribuição geográfica

Lamarck descreveu a espécie *C. angulata* como originária do sudoeste europeu (Batista, 2007). No entanto, há indícios que esta é originária da Ásia, uma vez que amostras portuguesas e espanholas de *C. angulata* partilhavam o mesmo nível de diversidade genética mitocondrial com amostras taiwanesas, levando a crer que a ostra portuguesa seja originária de Taiwan (Boudry *et al.*, 1998). Presentemente distribui-se ao longo da costa sul e este de Portugal, na costa sul de Espanha, na costa atlântica de Marrocos e em Taiwan (Fabioux *et al.*, 2002) (Figura 1.1).

A ostra do Pacífico, *C. gigas*, presume-se que seja endémica da região Oeste do Norte do Pacífico. Dada a sua natureza resistente a patologias, rápido crescimento e valor comercial, foi introduzida com sucesso em várias regiões do globo e tem no momento uma distribuição mundial. São encontradas populações naturalizadas pela costa europeia, costa Oeste da América do Norte, África do Sul, Nova Zelândia e Austrália (Batista, 2007) (Figura 1.1).



Figura 1.1 - Distribuição atual das espécies *C. angulata* e *C. gigas* (Batista, 2007).

1.3.3 Habitat

Ambas *C. angulata* e *C. gigas* são encontradas em estuários, lagoas e rias, tanto na zona intertidal baixa como na subtidal (Batista, 2007), até 40 m de profundidade (Boudry *et al.*, 1998). Estabelecem-se fixando a valva inferior em substratos variados como lodo, silte dura, areia lodosa, fundos rochosos, gravilha lodosa com conchas e até em materiais diversos provenientes da actividade humana. São espécies mais frequentemente encontradas em águas

salobras, no entanto são eurihalinas, sendo capazes de sobreviver tanto em baixa salinidade (<10 ‰) por pequenos períodos de tempo como em condições de salinidade marinha (35 ‰), sendo o seu intervalo ótimo de salinidade entre 20 e 25 ‰ (FAO, 2003; Ruano, 1997). Sobrevivem no intervalo de temperaturas entre -1,8°C e 35°C, evidenciando também uma boa tolerância às flutuações de temperatura (FAO, 2003).

1.3.4 Anatomia

O género *Crassostrea* caracteriza-se por apresentar uma concha inequivalve, sendo que as duas valvas que constituem a concha têm tamanho e forma diferentes, com a valva esquerda a ser maior e côncava enquanto a direita é normalmente mais plana ou ligeiramente convexa (Figura 1.2). De uma forma geral a concha é oval e alongada, porém a forma das conchas é altamente variável e geralmente é condicionada pelo tipo de substrato onde os indivíduos se desenvolvem, assim como outros factores como o excesso de indivíduos por metro quadrado (Batista, 2007). O exterior da valva esquerda apresenta pregas radiais espaçadas e a valva direita tem estrias de crescimento muito lameladas, mostrando-se branco-amareladas ou creme, com raios ou flâmulas castanhas ou púrpura (IPIMAR, 2008). O interior é branco com impressões musculares densamente pigmentadas no caso de *C. angulata* e menos pigmentada no caso de *C. gigas* (IPIMAR, 2008). Possui 2 dentes em cada extremidade da charneira, da qual o ligamento fica afastado (Vilela, 1975). A ostra do Pacífico pode atingir comprimentos na ordem dos 300 mm de comprimento, mas normalmente tem entre 80 a 150 mm (FAO, 2003), enquanto a portuguesa atinge uma média de 150 mm (IPIMAR, 2008).



Figura 1.2 – Vista interior e exterior da valva esquerda de *C. gigas*. (<http://www.willabay.com/images/pacificoysters.jpg>)

1.3.5 Nutrição, reprodução e ciclo de vida

As ostras *C. angulata* e *C. gigas*, como a maioria dos bivalves, são filtradoras, alimentando-se usando as suas brânquias para remover da água partículas suspensas. *C. gigas* consegue capturar uma elevada variedade de partículas como bactérias, protozoários, microalgas, larvas e detritos de invertebrados, no entanto apenas algumas microalgas e bactérias são digeridas enquanto as outras são eliminadas como fezes (Batista, 2007). Esta espécie adquire nutrientes por absorção directa de material orgânico dissolvido na água do mar (Manahan, 1990).

Verificou-se que o seu consumo de oxigénio é condicionado pela temperatura (consequentemente também pela estação do ano) e pelo tamanho corporal do indivíduo (Batista, 2007).

O género *Crassostrea* é um exemplo de hermafroditismo sucessivo, geralmente do tipo protândrico, em que os indivíduos maturam inicialmente como machos, mas entre épocas de reprodução podem cambiar para fêmeas (Schuller, 1998). Há uma correlação entre uma maior percentagem de fêmeas e maior disponibilidade de alimento, sendo que estas podem reverter a machos quando o alimento é limitado ou quando há elevada densidade de indivíduos (FAO, 2003).

A gametogénese ocorre em temperaturas na ordem dos 10°C e com salinidades entre 15‰ e um máximo de 32‰, sendo que valores superiores são limitantes (FAO, 2003; Vilela, 1975). A desova ocorre no início do verão, geralmente com temperaturas a rondar os 20°C e a fecundação ocorre em meio marinho (Batista, 2007; FAO, 2003; Schuller, 1998). A ostra tem uma elevada capacidade reprodutiva, uma vez que *C. gigas* é capaz de produzir até cerca de 100 milhões de ovos (Batista, 2007; Schuller, 1998), enquanto que em *C. angulata* registaram-se valores significativamente inferiores, entre 1 e 2 milhões (Vilela, 1975). Após a fecundação, o ovo sofre divisões sucessivas até se atingir a fase larvar, ao fim de 24h, e cerca de 15 a 20 dias depois as larvas perdem o seu aparelho locomotor e ganham capacidade de fixação, passando do estado pelágico ao bentónico (Schuller, 1998). Após se fixarem, sofrem metamorfose e assumem a forma juvenil (FAO, 2003). De seguida, dá-se a fase de crescimento e engorda, sendo que as ostras podem chegar ao tamanho comercial entre 18 a 30 meses (FAO, 2003), ou em apenas 6 meses como verificado em *C. gigas* no estuário do Sado por Pessoa & Oliveira (2006).

1.4 ESTUÁRIO DO SADO

O estuário do Sado localiza-se na península de Setúbal (30° 04' N, 09° 24' W), na costa Oeste de Portugal, sendo o segundo maior estuário do país, com uma área aproximada de 24 mil hectares (Caeiro *et al.*, 2005). Para além da sua importância económica e industrial, o estuário corresponde maioritariamente a uma área de elevado interesse natural e ambiental, sendo classificada em diversos estatutos de conservação da natureza, tais como Reserva Natural, Zona de Proteção Especial (Diretiva Aves, 79/409/CEE) e Sítio Ramsar nº 826, protegidos pelos respetivos Decretos-Lei (Caramelo *et al.*, 2011).

É compreendido por duas zonas principais, o estuário interior e o exterior, e duas secundárias, os esteiros da Marateca e Comporta, que constituem a zona intertidal (Caeiro *et al.*, 2005; Coutinho, 2003). O estuário interior corresponde ao Canal de Alcácer, de onde provém o Rio Sado, enquanto o estuário exterior corresponde ao canal que desemboca na Baía de Setúbal e posteriormente no Oceano Atlântico. Este estuário exterior divide-se do estuário interior por características geomorfológicas, sendo que a entrada dos esteiros e do Canal de Alcácer tem características intertidais (Caeiro *et al.*, 2005). É constituído por dois canais Norte e Sul separados por bancos de areia intertidais. No primeiro verificam-se correntes residuais fracas com profundidade média de 10 m, o que permite um maior depósito de sedimentos e, consequentemente, poluentes (Caeiro *et al.*, 2005; Coutinho, 2003). O canal Sul tem uma profundidade média de 35 m e é bastante mais dinâmico, sendo as marés as principais causadoras da circulação da água (Caeiro *et al.*, 2005; Coutinho, 2003).

1.5 QUALIDADE E SEGURANÇA

Cada vez mais a qualidade e a segurança dos produtos alimentares se consideram uma prioridade tanto para os profissionais do setor alimentar e autoridades de fiscalização da saúde pública, como para o próprio consumidor.

Apesar da definição de qualidade ser muito ampla e subjetiva, variando com o tipo de produto alimentar, pode-se afirmar que esta é a soma de uma série de atributos e características físicas e químicas ideais que o alimento deve possuir para que corresponda às expectativas do consumidor (Bremmer, 2000). Estes atributos são, entre outros, a segurança ou salubridade, as características organolépticas e o seu valor nutricional.

Dada a sua natureza filtradora, os bivalves são organismos mais propensos a acumular na sua constituição compostos orgânicos e inorgânicos que estejam presentes na água do local em que se encontram, incluindo metais pesados, bactérias e vírus. Por esta razão, e porque estes organismos são, na sua maioria, consumidos crus, torna-se imperativo que estes sejam submetidos a uma depuração antes de serem consumidos, dependendo da classificação das zonas de produção de bivalves, definida pelo IPMA, I.P., tendo por base os Regulamentos (CE) n.º853/2004 e n.º854/2004 (Parlamento Europeu, 2004a, 2004b). Porém, embora o processo depurativo permita eliminar eficazmente contaminantes microbianos fecais, não é tão eficaz a remover contaminantes virais e pouco, ou nada, eficaz a remover biotoxinas, metais pesados ou químicos orgânicos (Lee, Lovatelli, & Ababouch, 2008).

1.5.1 Contaminantes ambientais

Os contaminantes podem ser definidos como substâncias (químicas, físicas ou biológicas) presentes num determinado local em quantidades superiores às próprias do dito local ou substrato, durante um período de tempo suficiente para que seja considerado como ofensivo à saúde humana, animal ou vegetal (Albert, 1997).

Os metais são um exemplo de contaminante ambiental químico encontrados nas ostras, porém, nem todos são prejudiciais para os sistemas biológicos. Alguns são até essenciais para o correto funcionamento do organismo animal, em doses reduzidas, designando-se macro e micronutrientes, tais como o sódio, potássio, cálcio, zinco, magnésio, cobre e ferro. Há os que são essenciais ou contaminantes consoante a sua concentração nos tecidos, como o crómio, zinco, ferro, cobalto, manganês e níquel. Outros são efetivamente contaminantes ambientais, como o arsénio, cádmio, chumbo e mercúrio, sendo os três últimos considerados metais pesados. Excetuando o arsénio, nenhum destes se encontra naturalmente em nenhum organismo, não desempenhando funções metabólicas vitais, podendo ser tóxicos mesmo em concentrações diminutas (IPIMAR, 2008; Rocha, 2009).

Circulam e incorrem naturalmente pelos ciclos biogeoquímicos, em concentrações baixas e resultantes da erosão natural das rochas, no entanto, resíduos de atividades antropogénicas de origem industrial, mineira e agropecuária aumentam a sua concentração para valores que ultrapassam a capacidade dos mecanismos naturais de degradação (**Erro! A origem da r**

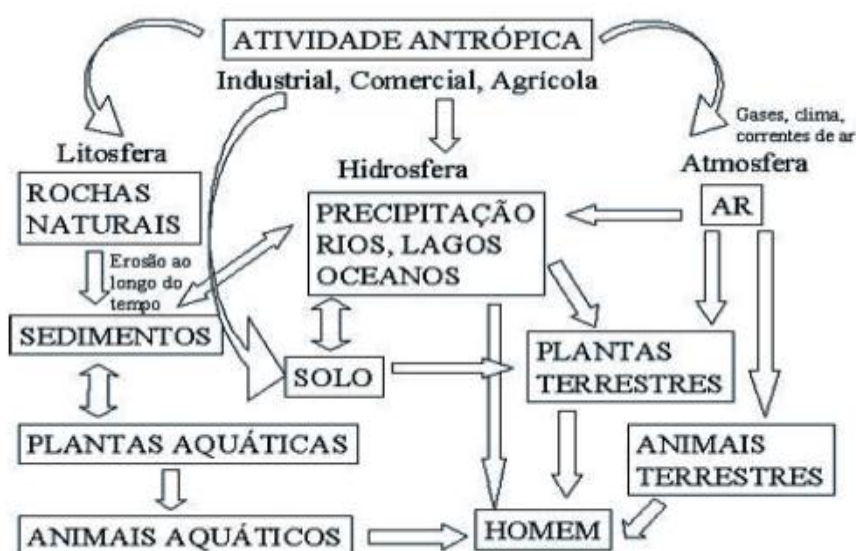


Figura 1.3 - Esquema ilustrativo do ciclo geral da contaminação por metais pesados. (Rocha, 2009)

eferência não foi encontrada.) (Albert, 1997; IPIMAR, 2008). Quando esta capacidade é ultrapassada, dá-se a sua bioacumulação pelos seres vivos presentes nos locais contaminados, entrando desta forma na cadeia alimentar (IPIMAR, 2008; Rocha, 2009).

De uma forma geral, os metais entram pelo organismo dos moluscos bivalves quando estes ingerem partículas orgânicas ricas nos primeiros. Uma vez no organismo, os metais ligam-se fortemente com proteínas como a metalotioneína e acumulam-se em grânulos amorfos. Esta proteína tem uma elevada afinidade para cádmio e zinco, o que, aliado à baixa excreção dos grânulos, conduz a uma acumulação dos metais nas células (em formas não tóxicas) (Amaral *et al.*, 2005). No caso da ostra, a sua elevada capacidade de acumular metais nos tecidos moles está bem documentada e pode variar temporalmente consoante o seu tamanho, peso, fase do ciclo reprodutivo e salinidade do meio (Ferreira *et al.*, 1990).

1.5.1.1 Contaminantes ambientais no estuário do Sado

O canal Norte do estuário do Sado banha a zona Sul da Península da Mitrena, local fortemente industrializado por estabelecimentos de elevada importância económica para a região e para o país, mas cujos efluentes potencialmente ainda são descarregados no estuário (Caramelo *et al.*, 2011; Coutinho, 2003). Das indústrias localizadas nesta zona do estuário, destacam-se como mais poluentes, para além das atividades portuárias e das minas de cobre, as dedicadas à produção de celulose e papel, pesticidas, fertilizantes, indústrias do ramo alimentar e estaleiros navais (Caeiro *et al.*, 2005; Coutinho, 2003). As zonas sul e sueste do estuário também sofrem ação antropogénica, dada a existência de culturas agrícolas que se tornam fonte de contaminação das águas do estuário, dada a acumulação de pesticidas, inseticidas, herbicidas e fertilizantes nas águas de escorrência dos terrenos agrícolas (Sequeira *et al.*, 2009). As localizações destas indústrias e explorações agrícolas coincidem com os locais determinados por Caeiro *et al.* (2005) como os mais contaminados por metais pesados, assim como os locais de entrada dos esteiros que apresentam sedimentos ricos em matéria orgânica. Estes autores realizaram uma avaliação da contaminação por parte de metais dos sedimentos do estuário exterior, tendo concluído que 3% dos locais apresentavam contaminação elevada e representavam risco de impacto negativo em sistemas biológicos, enquanto 47% apresentava contaminação moderada (Caeiro *et al.*, 2005). O cádmio, arsénio e cobre apresentaram concentrações mais preocupantes e as suas distribuições foram similares (Figura 1.4).

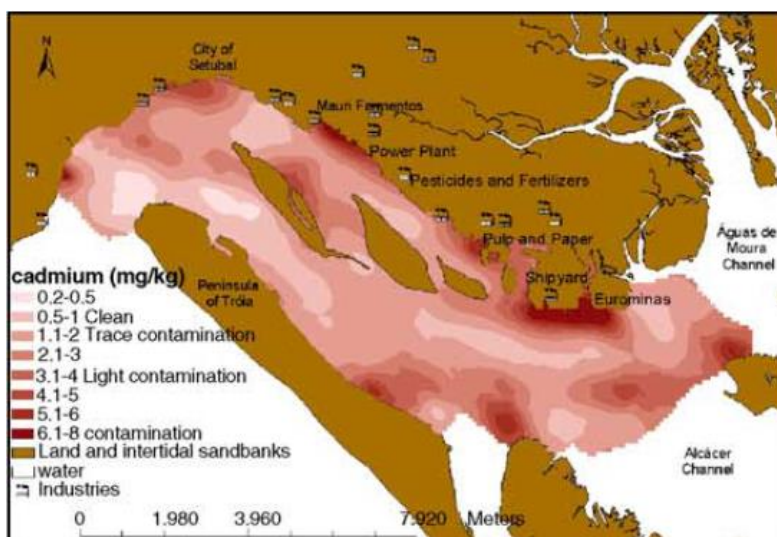


Figura 1.4 - Teor de cádmio (mg/kg) no estuário exterior do Sado analisado por Caeiro *et al.*(2005).

1.5.1.2 Legislação alimentar para os metais pesados

Devido ao seu caráter tóxico para a saúde humana, estabeleceram-se limites legais para alguns metais pesados como o cádmio, chumbo e mercúrio, eventualmente presentes em produtos de pesca.

O cádmio normalmente está presente em teores baixos nos alimentos, com exceção dos bivalves que tendem a acumular mais cádmio devido à presença da metalotioneína na sua constituição (IPIMAR, 2008; Jakimska, Konieczka, Skóra, & Namieśnik, 2011). Segundo o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 (Parlamento Europeu, 2006a), o cádmio não pode exceder 1 mg/kg de peso húmido em moluscos bivalves.

No caso do chumbo, este é o metal mais presente, tanto no meio ambiente como nos sistemas biológicos. Dados os seus variados usos industriais, o chumbo torna-se facilmente um contaminante atmosférico e, consequentemente, alimentar (IPIMAR, 2008). Tal como o cádmio, habitualmente os produtos alimentares contêm baixos teores de chumbo (< 1 mg/kg), porém o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 (Parlamento Europeu, 2006a) estabelece teor máximo permitido de 1,5 mg/kg de peso húmido de moluscos bivalves.

O mercúrio é o metal mais versátil no que diz respeito às formas químicas que pode tomar, desde o seu estado elementar até compostos orgânicos ou inorgânicos, apresentando níveis de toxicidade variados (IPIMAR, 2008). O pescado é dos alimentos que mais mercúrio possui, sob a forma de metilmercúrio. O Regulamento (CE) n.º 1881/2006 (Parlamento Europeu, 2006a) estabelece 0,5 mg/kg como teor máximo permitido de mercúrio nos moluscos bivalves.

O arsénio, embora não seja um metal pesado, mas sim um metaloide, também está presente na alimentação humana através do pescado (Lidon & Silvestre, 2010). Contudo, não há nenhuma legislação que estipule o teor máximo permitido do arsénio nos produtos da pesca. Provavelmente a falta de legislação deve-se ao facto do arsénio assumir maioritariamente as formas orgânicas de arsenobetaina e arsenocolina no pescado, que, ao contrário das formas inorgânicas, não se têm mostrado tóxicas, sendo rapidamente excretadas pelo organismo (ATSDR, 2007).

1.5.2 Perfil nutricional de *Crassostrea* spp.

As ostras são dos alimentos mais completos nutricionalmente, uma vez que têm um valor calórico baixo e pouca gordura, assim como um teor elevado de proteína, fósforo, potássio, sódio, e teores significativos de cálcio, ferro, zinco e iodo (INSA, 2015; IPIMAR, 2008; Vilela, 1975).

Na Tabela 1.1 são apresentados dados nutricionais de referência para a ostra do Pacífico, analisados pelo IPIMAR (2008) e pelo INSA (2015), bem como dados resultantes de estudos académicos, referentes à composição nutricional de ostras provenientes do Estuário do Sado, tais como Coutinho (2012) e Oliveira (2012), em maio e entre março e julho, respetivamente.

Tabela 1.1 - Dados da literatura relativos à composição química aproximada (%) de *Crassostrea* spp.

Humidade (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Cinza (%)	Glicogénio (%)	Fonte	Espécie
82,1	9,4	2,3	1,2	4,9	IPIMAR (2008)	<i>C. gigas</i>
83	8,6	1,7	3,9	2,7	INSA (2015)	<i>C. gigas</i>
78,3	10,8	2,1	2,6	-	Coutinho (2012)	<i>C. gigas</i>
80,5	12,5	1,1	3	2,2	Oliveira (2012)	<i>C. angulata</i>

Apesar de existirem valores nutricionais de referência, a composição nutricional da parte edível das ostras nunca se mantém constante ao longo das estações do ano, não só ocorrendo diferenças entre espécies, mas também dentro da própria espécie. Estas diferenças devem-se a vários factores como a variação da temperatura, qualidade e quantidade disponível de alimento, fase do ciclo de reprodução e quantidade de reservas metabólicas armazenadas para serem investidas no mesmo (Ren *et al.*, 2003).

A fração edível da ostra tem como principal constituinte a água, representando cerca de 80% do seu todo, encontrando-se ligada fortemente às proteínas estruturais que mesmo sob alta pressão é de difícil extração, sendo um indicador de frescura (Asha *et al.*, 2014). Estudos

conduzidos com *C. gigas* concluíram que o teor de humidade se mantém constante entre estações do ano (Linehan *et al.*, 1999), apenas ocorrendo uma diminuição de 10% no primeiro ano de vida, mais concretamente durante época reprodutiva (Deslous-Paoli & Héral, 1988).

Quanto ao teor de proteína, este varia consoante a temperatura da água (Ren *et al.*, 2003). De acordo com Deslous-Paoli & Héral (1988), mantém-se constante durante o inverno e aumenta rapidamente na primavera, antecipando a gametogénese e diminuindo novamente quando esta se inicia. Cerca de 10% da fração edível da ostra é proteína, que corresponde a 20% da dose de referência para a ingestão de proteína por parte de um adulto com uma dieta de 2000 kcal (Parlamento Europeu, 2011). As ostras analisadas por Oliveira (2012) como apresentam teores na ordem dos 12% podem ser consideradas como fonte de proteína, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1924/2006 (Parlamento Europeu, 2006b).

No que toca ao conteúdo mineral (cinza), este é ligeiramente mais baixo na ostra do que noutras espécies de pescado (Asha *et al.*, 2014), mas também pode ser influenciado pela presença de pequenas partículas de areia (IPIMAR, 2008). À semelhança do teor de proteína, varia consoante a fase do ciclo de reprodução, diminuindo no período de gametogénese e aumentando com a desova (Deslous-Paoli & Héral, 1988). Na Tabela 1.2 são apresentadas as DDR dos minerais presentes nas ostras, estabelecidos pelo Regulamento (UE) n.º 1169/2011 (Parlamento Europeu, 2011), assim como os valores minerais de referência medidos pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA, 2015).

Em 100 g de fração edível de ostra destacam-se os 910% da DDR de zinco, os 57% da DDR de ferro, assim como os 19% a 37% da DDR de sódio e os 20% da DDR de fósforo (Tabela 1.2). De acordo com o Regulamento (CE) n.º 1924/2006 (Parlamento Europeu, 2006b), pode-se afirmar que a ostra é rica em zinco, ferro e sódio e fonte de fósforo.

Em média, o teor de gordura é baixo (IPIMAR, 2008) e mantém-se praticamente constante, mas podem ocorrer alguns picos, influenciados pela disponibilidade de alimento, aumentando com os *blooms* de fitoplâncton, e pela fase do ciclo reprodutivo, aumentando com a gametogénese e diminuindo com a desova (devido ao elevado valor energético dos gâmetas) (Linehan *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2003). O mesmo ocorre com os teores de glicogénio, mas de uma forma bem mais acentuada (Deslous-Paoli & Héral, 1988; Linehan *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2003). O glicogénio é considerado a maior fonte de energia nos bivalves (Ren *et al.*, 2003) e, em comparação com espécies de pescado em geral, as ostras apresentam teores mais elevados deste constituinte (Asha *et al.*, 2014).

Tabela 1.2 - Dose Diária Recomendada (DDR) dos minerais presentes na ostra, expressos em mg e valores minerais de referência em *C. gigas*, expressos em mg/100 g. * Não definida, estimada por Lidon & Silvestre (2010).

<i>Minerais</i>	<i>DDR (mg)</i>	<i>C. gigas (mg/100 g)</i>	<i>% DDR / 100 g</i>
<i>Sódio</i>	1000-2000*	370	19-37
<i>Potássio</i>	2000	260	13
<i>Cálcio</i>	800	66	8
<i>Fósforo</i>	700	140	20
<i>Magnésio</i>	375	36	10
<i>Ferro</i>	14	8	57
<i>Zinco</i>	10	91	910

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DESCRIÇÃO DOS CONJUNTOS DE AMOSTRAS DE OSTRAS

Foram seis as amostras utilizadas no presente estudo, todas provenientes do Estuário do Sado e colhidas no dia 11 de abril de 2016, em que quatro foram fornecidas pela Herdade do Pinheiro e as restantes duas pela Ostradamus S.A. e Exporsado Lda., respetivamente.

Apenas uma amostra corresponde à espécie *C. gigas*, aquela fornecida pela Ostradamus S.A., enquanto as restantes são da espécie *C. angulata*. Das fornecidas pela Herdade do Pinheiro: uma proveio diretamente do Banco Natural de ostras local; outra proveio do mesmo Banco Natural, mas já estava cultivada em tabuleiros na Herdade durante um ano; a terceira era uma ostra mais pequena (semente) proveniente do estuário do Mira e cultivada de forma suspensa durante 10 meses; a quarta era uma semente proveniente da Ria Formosa, Olhão, Algarve e cultivada de forma suspensa durante 7 meses (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Descrição e caracterização das amostras estudadas.

Designação atribuída	Espécie	Cultivo / Substrato	Fornecedor	Nº indivíduos fornecidos	Nº efetivos
<i>C. gigas</i> (G)	<i>C. gigas</i>	Tabuleiros	Ostradamus S.A.	26	26
Banco Natural (BN)	<i>C. angulata</i>	Sedimento	Herdade do Pinheiro S.A.	65	54
Herdade do Pinheiro (HP)	<i>C. angulata</i>	Tabuleiro	Herdade do Pinheiro S.A.	31	29
Exporsado (ES)	<i>C. angulata</i>	Tabuleiros	Exporsado Lda	26	26
Semente do Mira (HPSM)	<i>C. angulata</i>	Sacos australianos	Herdade do Pinheiro S.A.	30	20
Semente do Algarve (HPSA)	<i>C. angulata</i>	Sacos australianos	Herdade do Pinheiro S.A.	30	26
			Total	208	181

As seis amostras foram recolhidas de três locais distintos do estuário do Sado, dois deles no esteiro da Marateca (G e ES) e os restantes na entrada do canal de Alcácer (HP, HPSA, HPSM e BN), (Figura 2.1).

Após colheita, todas as amostras foram transportadas até à FCT-UNL em ambiente refrigerado e colocadas em arca congeladora à temperatura de -20°C, para minimizar efeitos de transferência de meios. Foram mantidas na arca congeladora até serem analisadas.

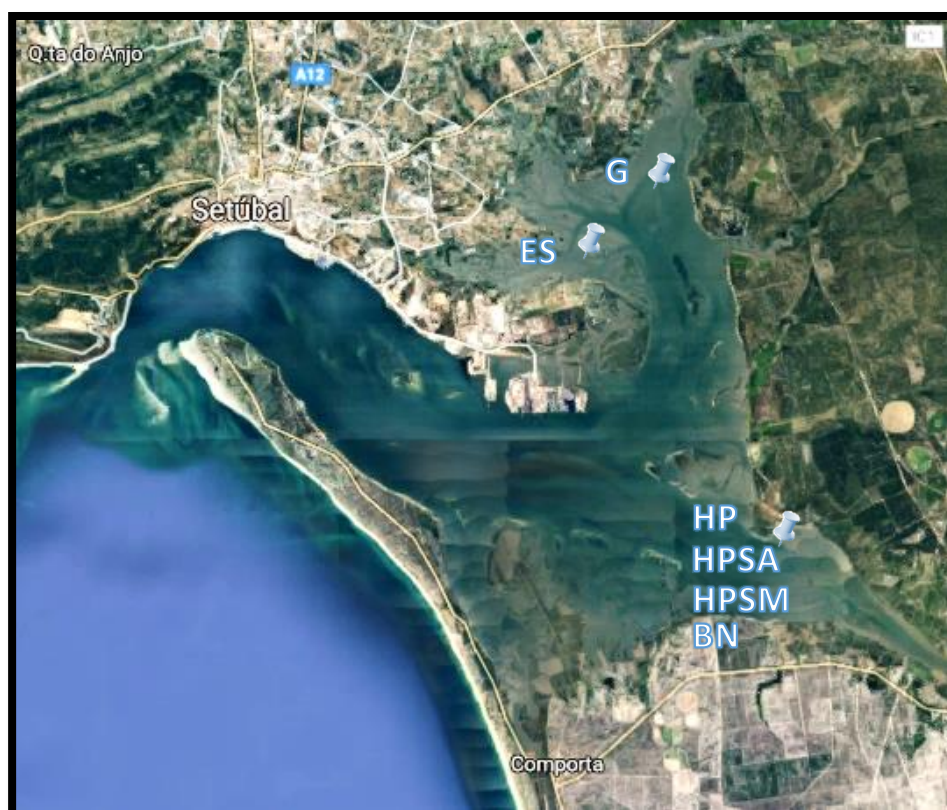


Figura 2.1 - Estuário do Sado e localizações dos locais de colheita das amostras. G – *C. gigas* fornecida pela Ostradamus S.A.; ES – *C. angulata* fornecida pela produtora Exporsado; HP – *C. angulata* fornecida pela Herdade do Pinheiro; HPSA – *C. angulata* juvenil proveniente do Algarve mas cultivada e fornecida pela Herdade do Pinheiro; HPSM – *C. angulata* juvenil proveniente do estuário do Mira mas cultivada e fornecida pela Herdade do Pinheiro; BN – *C. angulata* proveniente do Banco Natural local. Imagem adaptada de Google Maps.

2.2 BIOMETRIA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após a sua descongelação, as ostras foram limpas e de seguida determinaram-se os dados biométricos (comprimento, largura e espessura) e o peso de cada ostra intacta, de cada valva e da parte edível, com recurso a um paquímetro (à precisão de 1 mm) e a uma balança de precisão Nahita 5153 ($\pm 0,001$ g), respetivamente. Registou-se o número de ostras mortas em cada amostra, de forma a ser calculada a mortalidade, a qual foi obtida através da diferença entre o número exemplares antes da abertura das conchas e a constatação de conchas “vazias” ou com a fração edível em putrefação. As partes edíveis foram colocadas em sacos de amostra labelados consoante a sua proveniência e imediatamente congelados antes de serem transportados para o IPMA, I.P.. No transporte das amostras para o IPMA, I.P., também foram utilizadas malas térmicas refrigeradas em termoacumuladores a fim de evitar a descongelação do material biológico. Após a descongelação, as amostras foram colocadas em copos labelados e submetidas durante alguns segundos a um homogeneizador Politron PT3100 com regulação eletrónica, até se tornarem numa polpa homogénea. Retirou-se de cada copo de amostra o suficiente para cobrir o fundo de caixas Petri de plástico labeladas com o objectivo de serem

lioofilizadas. As amostras, tanto em copo como em caixa de Petri, foram sempre conservadas em arca congeladora a -20°C até serem analisadas.

2.3 ÍNDICES DE QUALIDADE

Para determinar a qualidade das ostras analisadas recorreram-se a dois índices, AFNOR e STI, ambos calculados no final das medições e pesagens biométricas.

O índice de qualidade AFNOR, determinado pela NF V45-056 de 1985 (Robert *et al.*, 1998), calcula-se através da divisão do peso, em gramas, da fração edível pelo peso total da ostra e ao resultado desta divisão multiplicar por 100. O índice exprime a percentagem de carne (fração edível) em relação ao peso total do indivíduo, permitindo classificar as ostras em duas categorias: "finas" e "especiais". São consideradas "finas" as ostras que apresentem um índice entre 6,5 e 9, "especiais" as que apresentem um índice superior a 9 e não são classificadas as que apresentem um índice inferior a 6,5.

$$AFNOR = \left(\frac{\text{Peso Parte Edível}}{\text{Peso Total}} \right) \times 100 \text{ (g)}$$

O espessamento da concha de uma ostra resulta de uma perturbação do seu mecanismo de formação do cálcio. Desta forma, ostras que apresentam um grande espessamento indicam a presença de compostos que lhes perturbem o sistema hormonal no sistema ambiental em que estão inseridas (Pessoa, sem data). O índice de espessamento da concha (STI) (Alzieu *et al.*, 1981), está inversamente relacionado com a poluição, mais concretamente por Tributyl-de-estanho (TBT) (biocida outrora massivamente utilizado em tintas anti vegetativas, aplicadas nos cascos dos navios). Calcula-se através da divisão do comprimento da valva direita pela sua espessura em milímetros. Índices de 1 a 2 indicam contaminação muito elevada, elevada de 3 a 4, intermédia de 5 a 7, baixa de 8 a 9 e a partir de 10 não se verifica contaminação.

$$STI = \frac{\text{Comprimento Valva Direita}}{\text{Espessura Valva Direita}} \text{ (mm)}$$

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Todos os ensaios foram realizados em triplicado para todas as amostras, exceto os teores de matéria gorda livre, cinza total e humidade que não se determinaram para as amostras HPSA e HPSM por pouca quantidade de fração edível.

2.4.1 Composição química aproximada

2.4.1.1 Gordura

O teor de gordura foi determinado através do procedimento técnico em uso na Divisão de Aquacultura e Valorização do IPMA, I.P., que por sua vez foi baseado no método descrito na NP 1972 (IPQ, 2009a).

O processo resume-se à extração da matéria gorda através de éter etílico e eliminação por recuperação do mesmo num extrator, seguida de secagem e pesagem final.

2.4.1.2 Cinza

O teor de cinza foi determinado através do procedimento técnico em uso na Divisão de Aquacultura e Valorização do IPMA, I.P., que por sua vez foi baseado no método descrito na NP 2032 (IPQ, 2009b).

O processo resume-se à secagem da amostra de ostra, seguindo-se a sua carbonização e incineração à temperatura de $500 \pm 25^{\circ}\text{C}$ e por fim a pesagem da massa do resíduo.

2.4.1.3 Humidade

O teor de humidade foi determinado através do procedimento técnico em uso na Divisão de Aquacultura e Valorização do IPMA, I.P., que por sua vez foi baseado no método descrito na NP 2282 (IPQ, 2009c).

O processo resume-se pela dispersão da amostra, secagem à temperatura de $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e arrefecimento até obtenção de peso constante.

2.4.1.4 Proteína

O teor em proteína foi determinado através de uma otimização do método de Dumas, descrita por Saint-Denis e Goupy (Saint-Denis & Goupy, 2004), usando-se para tal um analisador de azoto (LECO, FP-528).

O processo resume-se em pesar as amostras para cuvetes de estanho que por sua vez são colocadas no analisador onde ocorre a combustão da amostra com libertação de dióxido de carbono, água e azoto. É feita a leitura deste último por uma célula de condutividade, enquanto os restantes são removidos por absorção.

2.4.1.5 Glicogénio

O teor de glicogénio foi determinado através de uma otimização do método Viles e Silverman (Viles & Silverman, 1949), em uso na Divisão de Aquacultura e Valorização do IPMA, I.P..

O processo resume-se na hidrólise das amostras previamente liofilizadas e precipitação do glicogénio, fazendo-se reagir em água ultra-pura (Milli Q Integral 3) e antrona o precipitado resultante. Finalmente, utiliza-se um espectrofotómetro para se ler a absorvância do complexo glicogénio-antrona, num comprimento de onda de 620 nm (Unicam, UV-2). A concentração de glicogénio nas amostras calcula-se através da equação da curva de calibração, traçada a partir das leituras obtidas para os padrões no espectrofotómetro a 620 nm contra o branco.

2.4.2 Caracterização mineral

2.4.2.1 Método Espectrofotométrico de Fluorescência Raio-X de Energia Dispersiva (ED-XRF)

Para a deteção do teor de minerais presentes nas amostras de ostra foi utilizado o método Fluorescência Raio-X de Energia Dispersiva (ED-XRF). Este baseia-se na utilização de um equipamento portátil que deteta a variação energética de eletrões através da sua excitação por raios-X e compara os seus picos de excitação no espectro electromagnético com uma base de dados, relativa aos comprimentos de onda de vários elementos já conhecidos, presente no equipamento (Figura 2.2).

Após a sua liofilização, coloraram-se as amostras em cuvetes e submeteram-se as mesmas, durante 360 segundos, à radiação raio-X num analisador portátil de raio-X Niton Thermo Scientific XL3t. As leituras foram feitas em atmosfera enriquecida em hélio e os resultados foram processados com recurso ao *software* do equipamento, “Niton Data Transfer – XL3t-36653”.

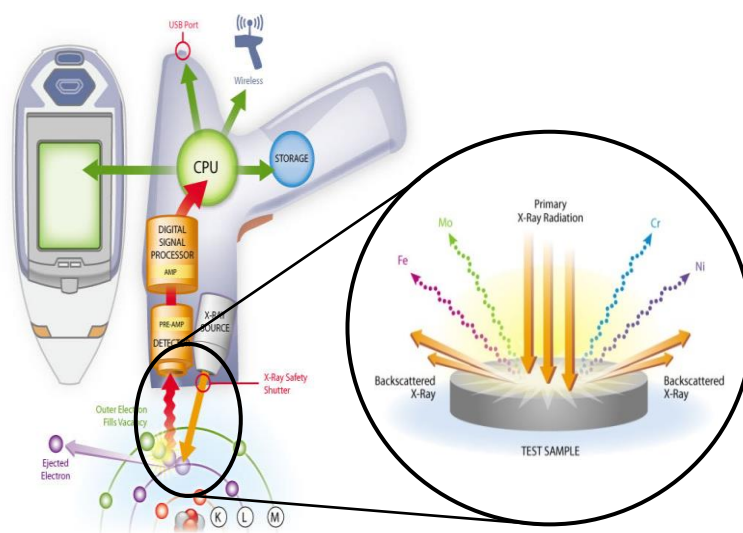


Figura 2.2 – Demonstração do funcionamento do analisador utilizado, Niton Thermo Scientific XL3t (<http://acceleratingscience.com/mining/wp-content/uploads/sites/3/2016/04/gun-diagram.jpg>; <http://www.911metallurgist.com/blog/wp-content/uploads/2013/08/XRF-primary-x-ray-radiation.jpg>).

2.4.2.2 Método Espectrofotométrico de Absorção Atômica em Forno de Grafite

O teor de cádmio foi determinado através do procedimento técnico em uso na Divisão de Aquacultura e Valorização do IPMA, I.P., utilizando para tal o método espectrofotométrico de absorção atômica em forno de grafite, baseado na EN 14084 (CES, 2003). Este método usa como princípio a emissão de energia por parte dos eletrões quando excitados, energia essa que absorve a radiação emitida por uma lâmpada de cátodo oco de cádmio.

O processo baseia-se na digestão das amostras (peso fresco) com ácido nítrico e peróxido de hidrogénio, por micro-ondas (CEM, MARS 5). Após diluição da solução resultante com água destilada, a solução foi lida no espectrofotómetro de absorção atômica em forno de grafite (Varian Spectr AA 220Z), onde se determina o teor de cádmio no comprimento de onda de 228,8 nm.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com exceção dos dados biométricos, todos os parâmetros foram medidos em triplicado e estatisticamente analisados com recurso aos softwares Statistica 7 e Microsoft Excel, com os quais se determinaram e compararam as médias por meio de ANOVA, assim como testes Tukey para verificar as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as várias amostras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 BIOMETRIA

A biometria e o peso de todos os indivíduos de cada amostra foram determinados, desde o comprimento e peso da ostra intacta e da parte edível, como apresentado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Médias e respetivos desvios padrão dos dados biométricos (mm), pesos totais (g) e Índices AFNOR das várias amostras.

Amostra	Biometria Ostra intacta (mm)			Peso (g)		
	Comprimento	Largura	Espessura	Total	Parte edível	Índice AFNOR (%)
<i>C. gigas</i> (G)	124,30 ± 8,3	65,62 ± 8,7	40,42 ± 5,5	136,68 ± 20,2	33,90 ± 9,8	24,7 ± 5,5
Banco Natural (BN)	67,35 ± 20	43,30 ± 11	28,31 ± 10,7	48,81 ± 43,4	7,28 ± 6,1	15,8 ± 4,2
Herdade do Pinheiro (HP)	71,79 ± 18	44,03 ± 6,3	33,17 ± 6,6	59,96 ± 25,4	9,43 ± 4,9	15,6 ± 4,1
Exporsado (ES)	63,58 ± 6,6	48,39 ± 5,4	31,50 ± 5,1	60,03 ± 14,4	9,31 ± 2,8	15,8 ± 3,7
Semente do Mira (HPSM)	48,30 ± 5	31,15 ± 4	20,90 ± 3,7	18,16 ± 4,2	3,44 ± 1	18,9 ± 3,6
Semente do Algarve (HPSA)	44,23 ± 5,8	33,23 ± 4,4	18,35 ± 2,1	13,68 ± 4,2	4,46 ± 1,3	32,8 ± 4,3

Os maiores e mais pesados indivíduos registaram-se na amostra de *C. gigas*, o que já seria expectável, uma vez que esta é uma espécie diferente e há registos de que o seu comprimento médio seja de 80 a 150 mm (FAO, 2003). A amostra com mais variação de comprimentos foi a Banco Natural, sendo que no estado selvagem é comum encontrar vários indivíduos em várias fases de crescimento. As amostras HPSA e HPSM apresentaram indivíduos mais pequenos, uma vez que se tratavam de juvenis cultivados em suspensão há 7 e 10 meses, respetivamente.

De todas as amostras fornecidas, a Banco Natural apresentou um maior número de mortalidades, seguida de perto pela Semente do Mira, como se observa na Tabela 3.2. A maior mortalidade da amostra proveniente do Banco Natural pode ser explicada pelo facto dos indivíduos estarem a crescer em meio natural mais sujeitos a condições adversas e sem qualquer intervenção humana, ao contrário das outras amostras. No que diz respeito à segunda amostra que registou mais mortalidade, esta compreende indivíduos juvenis com uma média de comprimentos de 48,30 mm, estando mais frágeis às condições adversas.

Tabela 3.2 - Número de indivíduos fornecidos para análise, número de efetivos e mortalidade para cada amostra.

<i>Amostra</i>	<i>Nº indivíduos fornecidos</i>	<i>Nº efetivos</i>	<i>Mortalidade (%)</i>
<i>C. gigas (G)</i>	26	26	0
<i>Banco Natural (BN)</i>	65	54	11
<i>Herdade do Pinheiro (HP)</i>	31	29	2
<i>Exporsado (ES)</i>	26	26	0
<i>Semente do Mira (HPSM)</i>	30	20	10
<i>Semente do Algarve (HPSA)</i>	30	26	4
<i>Total</i>	208	181	27

3.2 QUALIDADE

3.2.1 Índice de Qualidade AFNOR

O índice AFNOR, sendo um indicador da qualidade da ostra, expressa a relação entre o peso da parte edível e do peso total (Tabela 3.1). Todas as amostras se classificaram como “especiais”, apresentando um índice superior a 9. A Semente do Algarve obteve melhor resultado, com a parte edível correspondendo a 32,8% do peso total da ostra, seguida da amostra de *C. gigas* com 24,7%, depois da Semente do Mira (18,9%) e, por último, as amostras Banco Natural, Herdade do Pinheiro e Exporsado, todas com cerca de 16%. Este índice é um importante indicador comercial para os produtores, no qual estes se baseiam para perceber se a fase da engorda foi bem-sucedida e justificar um eventual preço superior de comercialização do seu produto.

3.2.2 Índice de Espessamento da Concha (STI)

Através do STI, é possível determinar uma eventual poluição por TBT do local onde a ostra se desenvolveu, através da avaliação da acumulação excessiva de cálcio. Este índice está inversamente relacionado com a poluição, sendo que menores valores equivalem a uma maior contaminação. No seu todo, nenhuma amostra indicou ter estado num local fortemente contaminado (Tabela 3.3).

As amostras que mais espessamento registaram foram as da Herdade do Pinheiro (5) e Banco Natural (6), com índices que demonstram poluição intermédia. Contudo, apresentaram desvios padrão de 1,6 e 2,4, demonstrando que alguns indivíduos destas amostras indicaram poluição elevada. As amostras que indicaram não possuir contaminação foram as de *C. gigas* (11) e da Semente do Algarve (10). Com pouca contaminação estiveram as amostras da Semente do Mira (9) e da Exporsado (8).

Tabela 3.3 - Índices de espessamento da concha (STI) calculados para cada amostra (média ± desvio padrão).

<i>Amostra</i>	<i>STI</i>
<i>C. gigas (G)</i>	11 ± 3
<i>Banco Natural (BN)</i>	6 ± 2,4
<i>Herdade do Pinheiro (HP)</i>	5 ± 1,6
<i>Exporsado (ES)</i>	8 ± 1,2
<i>Semente do Mira (HPSM)</i>	9 ± 3,5
<i>Semente do Algarve (HPSA)</i>	10 ± 3,9

De uma forma geral, as amostras cultivadas no esteiro da Marateca, G e ES, apresentaram bons resultados, principalmente a amostra G cujos indivíduos estavam cultivados mais a montante.

Os valores mais baixos de STI das amostras HP e BN explicam-se pelo facto de partilharem o local de cultivo e de origem. Também são as mais próximas da zona mais industrial do estuário, em relação às restantes, exceto as sementes HPSM e HPSA que apresentam maiores índices, provavelmente devido ao menor tempo de cultivo e, consequentemente, menor idade.

3.3 SEGURANÇA

3.3.1 Composição mineral

Na Tabela 3.4 estão apresentados todos os teores dos minerais considerados como mais relevantes do ponto de vista de salubridade, que foram detetados através do método ED-XRF.

Tabela 3.4 – Teores dos minerais detetados pelo Método Espectrofotométrico de Fluorescência Raio-X de Energia Dispersiva e respetivas médias dos limites de deteção (LD), medidos em matriz seca e expressos em mg/kg. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre amostras, com intervalo de confiança de 95%.

<i>(mg/kg)</i>	<i>Cu</i>	<i>As</i>	<i>Cd</i>	<i>Pb</i>	<i>Hg</i>
<i>C. gigas (G)</i>	300 ± 7,7 ^e	13,9 ± 2,08 ^a	<LD	<LD	<LD
<i>Banco Natural (BN)</i>	1194 ± 43,2 ^c	17,6 ± 1,17 ^a	<LD	<LD	<LD
<i>Herdade do Pinheiro (HP)</i>	1433 ± 53,4 ^a	18,9 ± 1,68 ^a	<LD	<LD	<LD
<i>Exporsado (ES)</i>	733 ± 46,8 ^d	15,9 ± 1,74 ^a	<LD	<LD	<LD
<i>Semente do Mira (HPSM)</i>	1312 ± 62,5 ^b	14,1 ± 3,07 ^a	<LD	<LD	<LD
<i>Semente do Algarve (HPSA)</i>	682 ± 2,3 ^d	15,7 ± 2,95 ^a	<LD	<LD	<LD
<i>LD</i>	13,96	1,69	4,27	1,89	4,33

A amostra Herdade do Pinheiro (indivíduos vindos do banco natural e cultivados na Herdade do Pinheiro há cerca de um ano) foi a que maior teor de cobre registou, com 1433 mg/kg,

enquanto a amostra de *C. gigas* registou o menor teor com apenas 300 mg/kg na sua constituição (Tabela 3.4). No que diz respeito à amostra da espécie *C. gigas*, o teor medido é semelhante ao medido no Japão (201-306 mg/kg) (Futagawa, Yoshie-Stark, & Ogushi, 2011). Quanto às restantes amostras de *C. angulata*, apesar de haver alguma variabilidade nos resultados (682-1433 mg/kg), estão de acordo com os teores medidos em vários tecidos da ostra portuguesa por Ferreira *et al.* (1990) também no estuário do Sado (1020-1890 mg/kg). Verificaram-se diferenças significativas entre todas as amostras, exceto a ES e a HPSA que não apresentaram diferenças entre si. Os maiores valores atingidos por BN, HP e HPSM estão em concordância com o estudo de Caeiro *et al.* (2005), que determinou ligeira contaminação de cobre no sedimento, aproximadamente na mesma área. O facto das amostras ES e G serem cultivadas a montante do esteiro da Marateca, justifica o seu menor teor de cobre dado a esta zona ser menos industrializada e onde se situa parte da zona protegida, levando a crer que a contaminação por cobre seja menor (Caramelo *et al.*, 2011). Quanto à amostra HPSA, esta não registou um teor tão elevado, apesar dos indivíduos desta serem cultivados no mesmo local que os das amostras BN, HP e HPSM, o que se pode explicar pelo seu tempo de cultivo relativamente curto (7 meses).

Os teores de chumbo e mercúrio não foram detetados, porém o limite médio de deteção do ED-XRF para estes elementos foi respetivamente de 1,89 mg/kg e 4,33 mg/kg (Tabela 3.4), que se situam acima dos teores máximos definidos pelo Regulamento (CE) n.º 1881/2006 (Parlamento Europeu, 2006a) para cada elemento (1,5 mg/kg e 0,5 mg/kg, respetivamente).

Os teores de arsénio variaram entre 13,9 mg/kg (G) e 18,9 mg/kg (HP) e as amostras não demonstraram diferenças significativas entre si (Tabela 3.4). As amostras Herdade do Pinheiro e Banco Natural registaram um maior valor que as restantes, o que é concordante com as análises realizadas ao sedimento por Caeiro *et al.* (2005) que determinaram uma maior concentração de arsénio aproximadamente no mesmo local. Contudo, não se sabe ao certo se as formas de arsénio que foram detetadas pelo ED-XRF eram inorgânicas ou orgânicas, não se podendo chegar a uma conclusão em relação à sua potencial toxicidade.

Quanto ao teor de cádmio, este mostrou-se mais elevado na amostra Herdade do Pinheiro com 1,1 mg/kg, tendo ultrapassado o limite legal da UE de 1 mg/kg (Gráfico 3.1). Seguem-se as amostras Banco Natural (de onde provêm os indivíduos da amostra HP) com um teor de 0,82 mg/kg, e da Semente do Rio Mira com um teor de 0,76 mg/kg que não demonstram diferenças significativas entre si. As amostras menos contaminadas revelaram ser a Semente do Algarve e a de *C. gigas*. Nas análises levadas a cabo com o método ED-XRF não se detetaram valores

específicos para o Cd, uma vez que o limite de deteção médio do equipamento era superior a 4,27 mg/kg (Tabela 3.4) e o máximo detetado com o método espectrofotométrico de absorção atómica em forno de grafite foi de 1,1 mg/kg. Desta forma, não é possível fazer uma comparação dos dois métodos quanto à precisão de deteção de Cd em tecidos de ostra. Para efeitos legais, será sempre conveniente (e obrigatório) considerarem-se apenas os valores obtidos pela técnica padronizada do método espectrofotométrico de absorção atómica em forno de grafite.

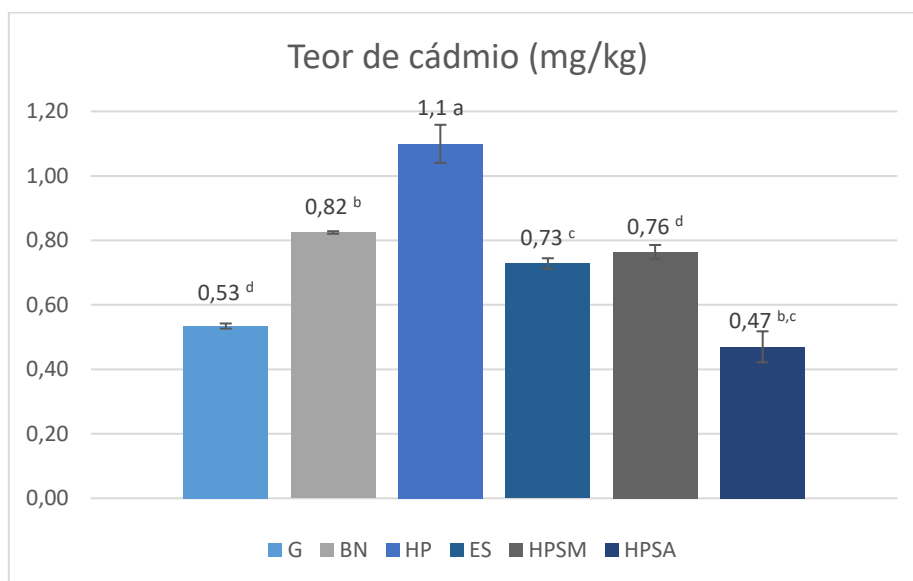


Gráfico 3.1 - Teor de cádmio (mg/kg) analisado pelo Método Espectrofotométrico de Absorção Atómica em Forno de Grafite, medido em matriz húmida. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre amostras, com intervalo de confiança de 95%.

De acordo com Caeiro *et al.* (2005), a zona próxima da Herdade do Pinheiro foi uma das que registou maiores teores de cádmio no solo, entre 5.1 e 6 mg/kg, o que pode explicar o maior valor desta amostra, assim como da amostra Banco Natural, que tem a mesma origem e localização semelhante. Por último, tal como já mencionado, Ferreira *et al.* (1990) mediu teores de Cd nos vários tecidos de *C. angulata* provenientes de bancos naturais mais a montante da Herdade do Pinheiro (no canal de Alcácer) e também registou valores elevados, desde 4,6 mg/kg até 40 mg/kg, este último no tecido do manto. No entanto, o mesmo autor afirmou que a acumulação de metais, como Zn, Cu e Cd, ocorre nos tecidos moles da ostra principalmente por causa de processos biológicos, apesar da potencial influência das condições hidrológicas na circulação de metais no estuário do Sado.

De uma forma geral, a amostra correspondente aos indivíduos da espécie *C. gigas* apresentou os valores mais baixos em cada elemento químico analisado, em comparação com as restantes amostras de indivíduos da espécie *C. angulata* (Gráfico 3.2). Em concordância com os teores de cinza medidos, a amostra Banco Natural também foi das que apresentou um maior teor cumulativo dos minerais analisados com recurso ao método ED-XRF, juntamente com a amostra Herdade do Pinheiro, seguida da amostra das sementes do Mira. A semelhança entre estas três amostras explica-se pela sua localização, já que a BN e a HP têm a mesma origem e a HPSM é cultivada no mesmo local, mesmo tendo origem noutra estuário. Como já mencionado, apesar da amostra HPSA também ser cultivada no mesmo lugar não apresentou tanta semelhança quanto ao seu teor mineral, provavelmente devido ao menor tempo de cultivo em comparação com as outras três amostras. Os teores mais baixos de ES e G podem estar relacionados com o facto de terem sido cultivadas num local com aparentemente menor incidência mineral do que as restantes, uma vez que estão a montante da zona industrializada da península da Mitrena.

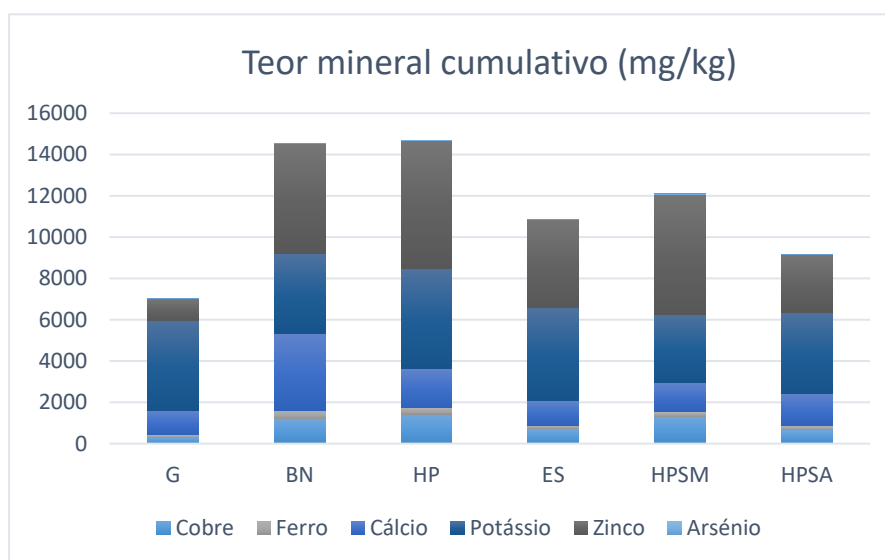


Gráfico 3.2 - Teores cumulativos dos minerais analisados em cada amostra pelo Método Espectrofotométrico de Fluorescência Raio-X de Energia Dispersiva, medidos em matriz seca e expressos em mg/kg.

Embora do ponto de vista nutricional um bom teor mineral seja positivo, as amostras com maiores teores também foram as que registaram um maior teor de cádmio (BN, HP e HPSM). Teores baixos deste metal são tolerados pelo organismo humano, porém, uma exposição continuada conduz a uma acumulação excessiva nos rins e eventualmente resultar em disfunção renal (IPIMAR, 2008). De acordo com o Painel em Contaminantes na Cadeia Alimentar da ESFA (EFSA CONTAM, 2011), há um limite tolerável de cádmio de 2,5 µg por kg de peso corporal que pode ser ingerido sem consequências para a saúde humana. Como exemplo, uma pessoa de 60 kg pode no máximo tolerar 0,15 mg de cádmio por semana, o que significa

que poderia comer no máximo 136 g, ou aproximadamente 14 exemplares, da ostra da amostra HP (1,1 mg/kg) para atingir o limite tolerável semanal.

3.4 PERFIL NUTRICIONAL DE *CRASSOSTREA* SPP.

3.4.1 Composição química aproximada

Analisou-se a composição química aproximada das ostras, como se apresenta na Tabela 3.5, pelo que apenas os teores de proteína e glicogénio foram determinados para todas as amostras.

Tabela 3.5 - Composição química aproximada (%) em matriz húmida das amostras analisadas (média \pm desvio padrão). Letras diferentes representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre amostras, com intervalo de confiança de 95%. *Valor estimado.

Amostra	Humidade	Proteína	Gordura	Cinza	Glicogénio
<i>C. gigas</i> (G)	87,51 \pm 0,04 ^a	6,65 \pm 0,12 ^b	1,14 \pm 0,10 ^c	2,64 \pm 0,01 ^b	0,09 \pm 0,01 ^b
Banco Natural (BN)	83,05 \pm 0,05 ^b	10,28 \pm 0,09 ^a	1,18 \pm 0,10 ^c	3,08 \pm 0,05 ^a	0,10 \pm 0,02 ^b
Herdade do Pinheiro (HP)	83,11 \pm 0,02 ^b	10,20 \pm 0,02 ^a	2,05 \pm 0,01 ^b	2,66 \pm 0,13 ^b	0,37 \pm 0,01 ^a
Exporsado (ES)	82,84 \pm 0,10 ^c	9,54 \pm 0,17 ^b	2,43 \pm 0,03 ^a	2,49 \pm 0,01 ^b	0,45 \pm 0,04 ^a
Semente do Mira (HPSM)	-	7,54 \pm 0,08 ^b	-	-	0,15 \pm 0,02 ^b *
Semente do Algarve (HPSA)	-	8,71 \pm 0,08 ^b	-	-	0,19 \pm 0,10 ^b *

A amostra com o maior teor de humidade registado foi a relativa às ostras da espécie *C. gigas* (87,51%), seguida pelas amostras Banco Natural, Herdade do Pinheiro e Exporsado (Tabela 3.5). Registaram-se, assim, diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre todas as amostras, exceto entre a Banco Natural e Herdade do Pinheiro. Em comparação com os dados da literatura, apresentados na Tabela 1.1, todas as amostras apresentam um maior teor de humidade. Contudo, o teor na amostra *C. gigas* é ligeiramente mais elevado, principalmente em relação aos analisados por Coutinho (2012) (78,3%), mas isso pode ser explicado pelo maior tamanho dos exemplares analisados, que apresentaram em média um comprimento de 124,3 mm e um peso da fração edível de 33,9 g, em contraste com as médias determinadas por Coutinho (2012): 72,3 mm e 7,97 g, respetivamente. Adicionalmente, há o potencial erro experimental associado ao escorrimento das amostras, que tem grande influência no teor de humidade, assim como para os outros constituintes. De forma a uniformizar a análise, a maioria dos autores escolhe fazê-la em matriz seca, porém, este método pode conduzir a outros erros, uma vez que o líquido intravalvar também influencia a composição química da ostra (um escorrimento excessivo pode conduzir à perda de complexos proteicos) (Oliveira, 2012). No presente estudo prepararam-se as amostras de forma a perder o mínimo de líquido

intravalvar, porém também se liofilizaram parte das amostras para se poder determinar o teor de glicogénio em matriz seca.

Quanto ao teor de proteína, este variou entre 6,65% (G) e 10,28% (BN) (Tabela 3.5). Apenas amostra de *C. gigas* se encontra mais díspar em relação aos dados de estudos anteriores (Tabela 1.1). Este valor mais baixo pode explicar-se pela elevada humidade da amostra, ou devido à eventual ocorrência da desova por parte dos indivíduos da mesma, uma vez que nesta altura o teor de proteína é conhecido por diminuir (Deslous-Paoli & Héral, 1988). Esta última hipótese é algo provável, já que as amostras foram recolhidas em abril e a desova de *C. angulata* no Estuário do Sado é conhecida por ocorrer no final da primavera/início do verão (Ferreira *et al.*, 1990). Registaram-se diferenças significativas entre o grupo BN-HP e as restantes amostras, sendo que este apresentou teores proteicos ligeiramente maiores. As semelhanças entre BN e HP, tal como mencionado anteriormente, podem ser explicadas com o facto dos indivíduos da amostra HP serem originalmente oriundos do mesmo banco natural que a amostra BN e estarem cultivados há um ano. Do ponto de vista nutricional as ostras das amostras Banco Natural, Exporsado e Herdade do Pinheiro são as mais relevantes, dado o seu teor rondar os 10%, que corresponde a 20% da dose de referência para a ingestão de proteína por parte de um adulto com uma dieta de 2000 kcal (Parlamento Europeu, 2011). No entanto, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1924/2006 (Parlamento Europeu, 2006b), não podem ser consideradas como fonte de proteína, já que não atingem os 12% da constituição do alimento.

As amostras apresentaram teores de gordura ligeiramente díspares dos dados da literatura ao nível da espécie, mas semelhantes ao nível do género (Tabela 1.1). Variaram entre 1,14% (G) e 2,43% (ES) (Tabela 3.5). Dentro da mesma espécie, ocorreram diferenças significativas entre as amostras Banco Natural, Herdade do Pinheiro e Exporsado, tendo estas duas últimas atingido maiores teores de gordura. A variação dentro da espécie pode ser explicada pelo facto do teor de gordura ser influenciado não só pela fase do ciclo reprodutivo, mas também por factores intrínsecos como o sexo, idade e tamanho e factores abióticos como a temperatura da água, disponibilidade de alimento e salinidade (Martino & Cruz, 2004). A temperatura influencia os teores de ácidos gordos no sentido em que quanto mais baixa é, mais ácidos gordos são produzidos pelas células do organismo para que se mantenha a fluidez das membranas celulares (Martino & Cruz, 2004).

O glicogénio é considerado a maior fonte de energia nos bivalves (Ren *et al.*, 2003). Contudo, os teores de glicogénio obtidos, no início de abril, apenas variaram entre 0,09% (G) e 0,45%

(ES), sendo valores bem mais baixos do que os obtidos por Oliveira (2012) na mesma estação do ano (2,20%) (Tabela 1.1). Há diferenças significativas entre o grupo HP-ES e as restantes amostras, tendo o mesmo atingido valores mais elevados. Porém, os resultados obtidos (Tabela 3.5) não foram concordantes com os dados da literatura (Tabela 1.1). À exceção dos dados obtidos por Oliveira (2012), que representam uma média de valores obtidos entre fevereiro e julho, os restantes dois autores apresentam valores médios anuais, o que pode explicar em parte a disparidade de resultados. Outra justificação para tão baixos valores poderá estar relacionada com a complexidade do método utilizado para a determinação deste componente, que traz algum erro experimental associado. No entanto, o glicogénio é dos parâmetros que mais varia ao longo do ciclo reprodutivo e diminui após a desova, de forma semelhante à proteína. Tal como admitido anteriormente, é possível que os indivíduos analisados estivessem na fase posterior à desova, o que justificaria os baixos teores de glicogénio (e de proteína, apenas no caso de *C. gigas*). Por haver pouca quantidade de fração edível, não foi determinada a humidade das amostras HPSA e HPSM. Esta foi extrapolada para 80%, um valor semelhante às restantes amostras, para ser possível fazer a conversão dos teores de glicogénio determinados em matriz seca para matriz húmida. Desta forma, os teores destas amostras devem ser só considerados como uma estimativa.

Os teores de cinza das amostras variaram entre 2,49% (ES) e 3,08% (BN) (Tabela 3.5), estando em concordância com os dados da literatura para o género *Crassostrea* (Tabela 1.1). Coutinho (2012) obteve um teor médio de 2,63% em *C. gigas*, bastante similar ao obtido para a amostra G (2,64%), medido na mesma estação do ano que o presente estudo (primavera). A amostra Banco Natural representa os indivíduos que estavam a desenvolver-se diretamente no sedimento, o que pode explicar o maior valor de minerais na sua constituição, incluindo a possibilidade de contaminação por parte de pequenas partículas de areia (IPIMAR, 2008). Esta foi a única amostra que mostrou diferenças significativas em relação a todas as outras. O seu teor está próximo do medido por Oliveira (2012), também a ostras portuguesas no estuário do Sado (2,99%).

3.4.2 Composição mineral

Na Tabela 3.6 estão apresentados todos os teores dos minerais considerados como mais relevantes do ponto de vista nutricional que foram detetados através do Método ED-XRF.

O teor de ferro registou uma variação entre 150 mg/kg (ES) e 421 mg/kg (BN) (Tabela 3.6). O teor medido na amostra *C. gigas* (148 mg/kg) é mais baixo do que o das ostras no Japão (220-373 mg/kg) (Futagawa *et al.*, 2011), mas mais elevado do que o medido pelo INSA (2015) (80

mg/kg). Os teores de ferro medidos nas amostras de *C. angulata* (150-421 mg/kg) estão maioritariamente de acordo com os teores medidos no estuário do Sado (Ferreira *et al.*, 1990) (170-652 mg/kg), excetuando a amostra ES que mostra um teor ligeiramente mais baixo. Observaram-se diferenças significativas entre algumas amostras, com exceção de G, ES e HPSA, assim como HPSA e HPSM que apresentaram semelhanças entre si.

Tabela 3.6 - Teores dos minerais com relevância nutricional detetados pelo Método Espectrofotométrico de Fluorescência Raio-X de Energia Dispersiva e respetivas médias dos limites de deteção (LD), medidos em matriz seca e expressos em mg/kg. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre amostras, com intervalo de confiança de 95 %.

(mg/kg)	Fe	Ca	K	Zn
<i>C. gigas</i> (G)	148 ± 4,6 ^d	1160 ± 117 ^b	4354 ± 312 ^a	1060 ± 41,5 ^e
Banco Natural (BN)	421 ± 3 ^a	3741 ± 1175 ^a	3841 ± 100 ^a	5324 ± 96,4 ^b
Herdade do Pinheiro (HP)	302 ± 38 ^b	1896 ± 445 ^b	4842 ± 652 ^a	6201 ± 253 ^a
Exporsado (ES)	150 ± 22,3 ^d	1209 ± 36 ^b	4479 ± 492 ^a	4267 ± 277 ^c
Semente do Mira (HPSM)	237 ± 37,2 ^c	1414 ± 370 ^b	3311 ± 639 ^b	5810 ± 204 ^{a,b}
Semente do Algarve (HPSA)	195 ± 6,3 ^{c,d}	1557 ± 106 ^b	3914 ± 53 ^a	2788 ± 33,1 ^d
LD (média)	15,85	24,78	45,8	23,97

Quanto ao cálcio, este atingiu maiores teores na amostra Banco Natural, com 3741 mg/kg (Tabela 3.6). Esta amostra foi a única a demonstrar diferenças significativas em relação a todas as outras, dado o seu valor ser quase três vezes mais elevado, no entanto foi a que relevou um maior desvio padrão (± 1175 mg/kg). Adicionalmente, esta foi das amostras que mais espessamento da concha demonstrou (Tabela 3.3), o que indica que esta acumulação excessiva de cálcio pode também refletir-se na composição da fração edível. A amostra de *C. gigas* foi a que apresentou o teor mais baixo de 1160 mg/kg, que também está de acordo com o índice STI obtido para esta amostra (11), tendo sido a que indicou menor espessamento da concha. Contudo, o teor de Ca da amostra G é mais elevado do que o determinado pelo INSA (2015) (660 mg/kg) e mais baixo do que o menor valor encontrado em ostras do Pacífico em Itália (1480 mg/kg) (Orban *et al.*, 2004).

Os teores de potássio variaram entre 3311 mg/kg (HPSM) e 4842 mg/kg (HP), havendo apenas diferenças significativas entre a amostra HPSM e as restantes (Tabela 3.6). Todas as amostras apresentaram valores superiores aos encontrados por Coutinho (2012) em ostras portuguesas no Sado, tanto em janeiro (2267 mg/kg) como em maio (1778 mg/kg). Também as ostras do Pacífico no Japão apresentaram um menor teor, entre 1830-2080 mg/kg (Futagawa *et al.*, 2011), assim como as de Itália (Orban *et al.*, 2004), em contraste com a amostra G que apresentou um teor de 4354 mg/kg. Porém, convém realçar que a técnica analítica de

determinação e quantificação deste elemento na fração edível no presente trabalho (ED-XRF) não foi a mesma do que os outros estudos, que utilizaram o método de espectrofotometria de absorção atômica com chama.

O zinco foi detetado de forma muito variável nas amostras, desde 1060 mg/kg (G) a 6201 mg/kg (HP) (Tabela 3.6). Esta variação reflete-se em diferenças significativas entre quase todas as amostras, exceto entre HPSM e HP e entre HPSM e BN. Os teores de zinco medidos na amostra de *C. gigas* foram relativamente próximos aos medidos pelo INSA (2015) (910 mg/kg) em ostras da mesma espécie, mas superiores aos medidos nas ostras no Japão (511-598 mg/kg) (Futagawa *et al.*, 2011). Quanto às restantes amostras, da espécie *C. angulata*, estas apresentaram teores variados, mas na sua maioria muito elevados. Contudo, conclui-se que estes estão em concordância e alguns até mais baixos do que os medidos por Ferreira *et al.* (1990) para os vários tecidos da ostra portuguesa no estuário do Sado, que registou teores de Zn entre 4000 mg/kg e 37400 mg/kg. Este autor mediu os teores de vários metais em ostras provenientes de bancos naturais mais a montante do canal de Alcácer do que as das amostras BN, HP e HPSM, o que pode explicar o seu valor superior em relação às restantes. É de notar o teor mais baixo da amostra HPSA em relação às outras 3 amostras também provenientes do mesmo local, principalmente em relação à HPSM. Isto pode ser explicado pelo menor tempo de cultivo da amostra HPSA de apenas 7 meses, em oposição aos 10 meses da amostra HPSM que permitiram uma maior bioacumulação de Zn.

Na Tabela 3.7 estão representadas as percentagens de DDR em relação ao teor mineral expresso em mg/100 g de fracção edível em matriz húmida, para cada amostra. São ainda realçados os elementos nos quais as amostras são “Fonte”(15% da DDR), ou “Ricas” (30% da DDR), de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1924/2006 (Parlamento Europeu, 2006b).

Tabela 3.7 - Percentagens de DDR do teor dos minerais calculadas para 100 g de amostra em matriz húmida.
Legenda: “Fonte”; “Rico”.

% DDR/100 g	Fe	Ca	K	Zn
<i>C. gigas</i> (G)	21	2,9	4,4	212
<i>Banco Natural</i> (BN)	60	9,4	3,8	1065
<i>Herdade do Pinheiro</i> (HP)	43	4,7	4,8	1240
<i>Exporsado</i> (ES)	21	3,0	4,5	853
<i>Semente do Mira</i> (HPSM)	28	3,9	3,9	558
<i>Semente do Algarve</i> (HPSA)	34	3,5	3,3	1162
DDR (mg)	14	800	2000	10

As amostras BN, HP e HPSA são ricas em ferro e as restantes são fonte deste mineral. Todas as amostras são ricas em zinco, chegando a atingir 1240 % da DDR nas ostras da amostra Herdade do Pinheiro. Foi estabelecido pelo *Food and Nutrition Board of The National Academies*, uma quantidade máxima tolerável por um adulto de 40 mg/dia de Zn (FNB-IOM, 2011). Assim, para se atingir o máximo diário tolerável de zinco bastaria ingerir cerca de 3 ostras da amostra HP. Porém, está comprovado que uma maior ingestão de zinco reduz a absorção de cádmio no organismo humano e que, consequentemente, uma deficiência deste mineral conduz ao aumento da absorção do metal pesado nos humanos (Brzóska & Moniuszko-Jakoniuk, 2001). À luz deste estudo, pode-se afirmar que não é tão preocupante o consumo da amostra HP que de todas as amostras foi a que demonstrou maiores níveis tanto de zinco, como de cádmio.

4 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Neste estudo pretendeu-se realizar uma avaliação preliminar da qualidade, segurança e perfil nutricional da fração edível de seis amostras de *Crassostrea* spp. em diferentes fases de desenvolvimento e provenientes de vários meios de cultivo e de um meio natural.

Determinaram-se índices avaliadores de vários aspetos relacionados com a qualidade da ostra, tais como o STI e o índice AFNOR. No primeiro, de uma forma geral, nenhuma amostra demonstrou forte contaminação. Apenas as amostras Herdade do Pinheiro e Banco Natural indicaram contaminação intermédia, pelo que as restantes indicaram leve contaminação ou nenhuma de todo, tal como a amostra de *C. gigas*. Os resultados do índice AFNOR provaram que todas as amostras eram constituídas por indivíduos da categoria de qualidade máxima, sendo consideradas “especiais”, concluindo-se que se desenvolveram numa proporção ideal de peso total/fração edível.

Para avaliar a segurança e salubridade das amostras de ostra, analisaram-se os teores de alguns metais pesados e metaloides através do método ED-XRF, e através do método espectrofotométrico de absorção atómica em forno de grafite para o cádmio. Maioritariamente, as amostras que demonstraram maior teores de metais, metaloides e minerais em geral, foram as que tiveram mais tempo de cultivo da Herdade do Pinheiro (HP e HPSM) e a do Banco Natural. Estas partilham a mesma localização que por sua vez está mais propícia um maior conteúdo mineral dada a sua proximidade à zona industrial, ao contrário das restantes amostras.

Dos compostos analisados, apenas o cádmio demonstrou ultrapassar ligeiramente os limites impostos pela UE (1 mg/kg) na amostra Herdade do Pinheiro (1,1 mg/kg). Porém, seria necessária a ingestão de 136 g destas ostras para que uma pessoa de 60 kg ultrapassasse o limite tolerável semanal de cádmio (2,5 µg/kg peso corporal). Não obstante, dados estes teores elevados de cádmio, deveria ser conduzido um estudo para a determinação da origem primordial deste metal no estuário do Sado, com o objetivo de melhorar a salubridade das ostras cultivadas e que mais tarde são comercializadas.

Alguns dos metais não foram analisados de forma completa, já que o seu teor era menor do que os limites médios de deteção do equipamento ED-XRF. No caso do cádmio, este facto ficou provado pela sua determinação através do método espectrofotométrico de absorção atómica em forno de grafite, sendo esta a técnica padronizada. Assim, conclui-se que não é possível fazer uma comparação dos dois métodos quanto à precisão de deteção de Cd em tecidos de

ostra, e que futuramente deve ser sempre preferida a técnica padronizada em análises desta natureza a este organismo.

Estimaram-se os perfis nutricionais de cada amostra através da determinação da sua composição química aproximada e pela análise dos minerais com interesse nutricional pelo método ED-XRF.

De um modo geral, em relação à literatura as amostras demonstraram teores elevados de humidade, similares teores de proteína (exceto a amostra de *C. gigas*, com um teor inferior) e cinza, teores de gordura semelhantes ao nível do género e teores baixos de glicogénio. Os elevados teores de água aliados aos baixos teores de gordura e glicogénio são mais valias do ponto de vista nutricional, confirmando-se que a ostra é um alimento ideal para dietas pouco calóricas.

Devido à falta de fração edível das amostras mais juvenis (HPSM e HPSA) foi difícil inferir com exatidão as diferenças da composição química entre várias fases de desenvolvimento da ostra. Contudo, nos teores de proteína e glicogénio conseguiram-se observar teores mais semelhantes entre estas amostras do que as restantes.

O teor mineral das amostras (Fe, Ca, K, Zn) mostrou-se relativamente similar à literatura. É de realçar que o teor de cálcio foi especialmente elevado na amostra Banco Natural. Uma vez que esta foi uma das duas amostras que mais espessamento da concha indicou, pode-se concluir que talvez esta acumulação excessiva de cálcio na concha, provocada por compostos disruptivos do sistema endócrino da ostra, também se reflita na composição química da fração edível.

De um ponto de vista nutricional, as amostras BN, HP e HPSA são ricas em ferro e as restantes são fonte deste mineral e todas as amostras são ricas em zinco. Apesar deste bom conteúdo mineral, as amostras que mais teor mineral demonstraram também foram as que registaram maior teor de cádmio (HP, BN, HPSM). Porém, uma vez que elevadas ingestões de zinco contrariam a absorção de cádmio pode-se concluir que o consumo destas amostras tem baixo risco associado dado o seu elevado teor de zinco.

Ocorreram, maioritariamente, diferenças significativas entre a amostra BN e as restantes, permitindo concluir que a composição química e mineral das ostras selvagens se distingue das ostras cultivadas em aquacultura.

Seria relevante que futuramente se completasse este estudo com dados referentes a outras épocas do ano para se registar o efeito da sazonalidade na composição química, nutricional e

mineral do género. Outro aspeto interessante a analisar em estudos futuros seria a qualidade sensorial, microbiana e patogénica das ostras amostradas, o que não foi possível dado a quantidade limitada de ostras fornecidas e tempo disponível.

Por fim, há a concluir que, de um modo geral, a ostra do Sado tem relativamente boa qualidade para os produtores e consumidores, mostrando rica composição química e mineral com elevados teores de proteína e baixos teores de gordura e glicogénio, provando ser uma boa aposta não só do ponto de vista nutricional como gastronómico.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, L. A. (1997). Contaminación ambiental. Origen, clases, fuentes y efectos. Em *Introducción a la toxicología ambiental* (pp. 37–52). Metepec: ECO.
- Alzieu, C., Heral, M., Thibaud, Y., Dardignac, M. J., & Feuillet, M. (1981). Influence des peintures antisalissures à base d'organostanniques sur la calcification de la coquille de l'huître *Crassostrea gigas*. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 45(2), 101–116. Obtido de <http://archimer.ifremer.fr/doc/1981/publication-1898.pdf%5Cnhttp://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1898/>
- Amaral, M. C. R., Rebelo, M. F., Torres, J. P. M., & Wolfgang, C. P. (2005). Bioaccumulation and depuration of Zn and Cd in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*, Guilding, 1828) transplanted to and from a contaminated tropical coastal lagoon. *Marine Environmental Research*, 59(4), 277–285. <http://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.05.004>
- Asha, K., Anandan, R., Mathew, S., & Lakshmanan, P. T. (2014). Biochemical profile of oyster *Crassostrea madrasensis* and its nutritional attributes. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40(1), 35–41. <http://doi.org/10.1016/j.ejar.2014.02.001>
- ATSDR. (2007). Toxicological Profile for Arsenic. *U.S Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 559. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2013/286524>
- Batista, F. (2007). *Assessment of the aquacultural potential of the Portuguese oyster Crassostrea angulata*. Universidade do Porto.
- Batista, F., Leitão, A., Huvet, A., Lapegue, S., Heurtebise, S., & Boudry, P. (2005). The Taxonomic status and origin of the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819). *The 1st International Oyster Symposium Proceedings*.
- Boudry, P., Heurtebise, S., Collet, B., Cornette, F., & Gérard, A. (1998). Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 226(2), 279–291. [http://doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00250-5](http://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00250-5)
- Bremmer, H. A. (2000). Toward practical definitions of quality for food science. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(1), 83–90. <http://doi.org/10.1080/10408690091189284>

- Brzóska, M. M., & Moniuszko-Jakoniuk, J. (2001). Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food and Chemical Toxicology*. [http://doi.org/10.1016/S0278-6915\(01\)00048-5](http://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00048-5)
- Caeiro, S., Costa, M. H., Ramos, T. B., Fernandes, F., Silveira, N., Coimbra, A., ... Painho, M. (2005). Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: An index analysis approach. *Ecological Indicators*, 5(2), 151–169. <http://doi.org/10.1016/j.ecolind.2005.02.001>
- Caramelo, A. R., Cornaglia, G., Bucho, J. L., Macedo, M., Santos, I. A., Pires, P., & Sacadura, P. (2011). Carta de risco da Península da Mitrena. Autoridade Nacional de Protecção Civil.
- CES. (2003). EN 14084 - Foodstuffs - Determination of trace elements - Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron by atomic absorption spectrometry (AAS) after microwave digestion. CES.
- Coutinho, M. T. (2003). *Comunidade Fitoplanctónica do Estuário do Sado. Estrutura, Dinâmica e Aspectos Ecológicos*. INIAP-IPIMAR. Obtido de https://www.ipma.pt/resources.www/docs/publicacoes.site/teses/Teresa_Pereira_Coutinho-thesis.pdf
- Deslous-Paoli, J.-M., & Héral, M. (1988). Biochemical composition and energy value of *Crassostrea gigas* (Thunberg) cultured in the bay of Marennes-Oléron. *Aquatic Living Resources*, 1, 239–249. <http://doi.org/10.1051/alr:1988024>
- EFSA CONTAM. (2011). Scientific Opinion. Statement on tolerable weekly intake for cadmium. *EFSA Journal*, 9(2), 19. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.1975>.
- Fabioux, C., Huvet, A., Lapegue, S., Heurtebise, S., & Boudry, P. (2002). Past and present geographical distribution of populations of Portuguese (*Crassostrea angulata*) and Pacific (*C. gigas*) oyster along the European and north African Atlantic coasts. *Société Française de Malacologie*, 31, 33–44. Obtido de archimer.ifremer.fr/doc/00000/2785/
- FAO. (2003). *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Database on Introductions of Aquatic Species. Fishery Records Collections. Obtido 10 de Julho de 2016, de http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en
- Ferreira, A. M., Cortesão, C., Castro, O. G., & Vale, C. (1990). Accumulation of metals and organochlorines in tissues of the oyster *Crassostrea angulata* from the Sado Estuary, Portugal. *The Science of the Total Environment*, 97–98, 627–639.

- [http://doi.org/10.1016/0048-9697\(90\)90266-W](http://doi.org/10.1016/0048-9697(90)90266-W)
- FNB-IOM. (2011). *Dietary Reference Intakes (DRIs): Tolerable Upper Intake Levels, Elements*. Obtido de [http://nationalacademies.org/hmd/~media/Files/Activity Files/Nutrition/DRI-Tables/4_ UL Values_ Vitamins and Elements.pdf?la=en](http://nationalacademies.org/hmd/~media/Files/Activity%20Files/Nutrition/DRI-Tables/4_UL%20Values_Vitamins%20and%20Elements.pdf?la=en)
- Futagawa, K., Yoshie-Stark, Y., & Ogushi, M. (2011). Monthly variation of biochemical composition of Pacific oysters *Crassostrea gigas* from two main cultivation areas in Japan. *Fisheries Science*, 77(4), 687–696. <http://doi.org/10.1007/s12562-011-0364-5>
- Gofas, S. (2015). *Crassostrea angulata* (Lamarck, 1819). MolluscaBase, World Register of Marine Species. Obtido 17 de Março de 2016, de <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=146900>
- INE. (2016). Estatísticas da Pesca 2015. Instituto Nacional de Estatística, I.P.
- INSA. (2015). Tabela da Composição dos Alimentos. Obtido 5 de Agosto de 2016, de <https://insa.foodcase.ch/foodcomp/food?467>
- IPIMAR. (2008). Produção, salubridade e comercialização de moluscos bivalves em Portugal. Ed. Silva, H. A.; Batista, I. *Publicações Avulsas do IPIMAR*. Lisboa.
- IPQ. (2009a). NP 1972 – Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação do teor de matéria gorda livre. Instituto Português da Qualidade.
- IPQ. (2009b). NP 2032 – Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação do teor de cinza total. Instituto Português da Qualidade.
- IPQ. (2009c). NP 2282 – Produtos da pesca e da aquicultura: Determinação da humidade. Instituto Português da Qualidade.
- Jakimska, A., Konieczka, P., Skóra, K., & Namieśnik, J. (2011). Bioaccumulation of metals in tissues of marine animals, part I: The role and impact of heavy metals on organisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(5), 1117–1125.
- Lee, R., Lovatelli, A., & Ababouch, L. (2008). *Bivalve depuration: fundamental and practice aspects*. FAO. *Fisheries Technical Paper*. Roma: FAO. Obtido de <http://www.fao.org/documents/card/en/c/91ea7200-8fdb-55ce-857b-a5816e157609/>
- Lidon, F., & Silvestre, M. (2010). *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*. Lisboa: Escolar Editora.

- Linehan, L., Connor, T., & Burnell, G. (1999). Seasonal variation in the chemical composition and fatty acid profile of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Food Chemistry*, 64, 211–214. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00144-7](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00144-7)
- Manahan, D. (1990). Adaptations by invertebrate larvae for nutrient acquisition from seawater. *Integrative and Comparative Biology*, 30(1), 147–160. <http://doi.org/10.1093/icb/30.1.147>
- Martino, R., & Cruz, G. (2004). Proximate composition and fatty acid content of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* along the year seasons. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(6), 955–960. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132004000600015>
- O’Foighil, D., Gaffney, P. M., Wilbur, A. E., & Hilbish, T. J. (1998). Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Marine Biology*, 131(3), 497–503. <http://doi.org/10.1007/s002270050341>
- Oliveira, M. (2012). *Moluscos bivalves em Portugal: composição química e metais contaminantes*. Universidade Nova de Lisboa. Obtido de <http://run.unl.pt/handle/10362/8466>
- Orban, E., Di Lena, G., Masci, M., Navigato, T., Casini, I., Caproni, R., ... Pellizzato, M. (2004). Growth, nutritional quality and safety of oysters (*Crassostrea gigas*) cultured in the lagoon of Venice (Italy). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(December 2003), 1929–1938. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1896>
- Parlamento Europeu. (2004a). Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*, (L 226), 22–82.
- Parlamento Europeu. (2004b). Regulamento (CE) n.º 854/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano. *Jornal Oficial da União Europeia*, (L 226), 83–127.
- Parlamento Europeu. (2006a). Regulamento (CE) n.º 1831/2003 da Comissão de 18 de Dezembro de 2003 que fixa os valores máximos de certos contaminantes presentes em géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, (L 325), 5–24.
- Parlamento Europeu. (2006b). Regulamento (CE) n.º 1831/2003 da Comissão de 18 de Dezembro de 2003 que fixa os valores máximos de certos contaminantes presentes em géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, (L 325), 5–24.

- Conselho de 20 de Dezembro de 2006 relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos. *Jornal Oficial da União Europeia*, (L 404), 9–25.
- Parlamento Europeu. (2011). Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro de 2011 relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, (L 304), 18–63.
- Pessoa, M. (sem data). *A Ostra: Manjar dos Deuses e símbolo ecológico*. Não publicado.
- Pessoa, M., & Oliveira, J. (2006). A Ostreicultura no estuário do Sado : perspectivas de sua recuperação. *1ª Conferência Lusófona sobre o Sistema Terra - CluSTer*, (Abril). <http://doi.org/10.13140/2.1.1494.7525>
- Ren, J. S., Marsden, I. D., Ross, A. H., & Schiel, D. R. (2003). Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 37(1), 171–182. <http://doi.org/10.1080/00288330.2003.9517155>
- Renault, T. (1996). Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 15(2), 551–561. Obtido de <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/2913/>
- Robert, S., Goulletquer, P., Soletchnik, P., Geairon, P., Le Moine, O., Razet, D., ... Taillade, S. (1998). *Affinage des huîtres creuses Crassostrea gigas en claires ostréicoles du Bassin de Marennes-Oléron: Etude des modifications de la Norme AFNOR-NF V 45056*. IFREMER DRY Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Rocha, A. (2009). *Cádmio, chumbo, mercúrio: a problemática destes metais pesados na Saúde Pública: monografia*. Universidade do Porto. Obtido de <http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/54676>
- Ruano, F. (1997). Fisheries and farming of important marine bivalves in Portugal. *NOAA Technical Report NMFS*, (129), 191–200.
- Saint-Denis, T., & Goupy, J. (2004). Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*, 515(1), 191–198. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.090>

- Schuller, M. J. (1998). Ostra (*Crassostrea* sp. e *Ostrea* sp.). Em M. A. Henriques (Ed.), *Manual de Aquacultura* (1ª, pp. 59–70). Porto: ICBAS-UP.
- Sequeira, M., Matias, S., Farinha, J. C., Gaspar, R., Silva, C., Augusto, J., ... Luís, A. . (2009). *Bases para o plano de acção para a salvaguarda e monitorização da população de Roazes do estuário do Sado*.
- Vilela, H. (1975). A respeito de Ostras. *Biologia - Exploração - Salubridade*. Lisboa: Novos Estudos, Sec. Estado Pescas.
- Viles, F. J., & Silverman, L. (1949). Determination of Starch and Cellulose with Anthrone. *Analytical chemistry*, 21(8), 950–953. <http://doi.org/10.1021/ac60032a019>